



Université de Montréal

**Sélection et polymorphisme chez des grenouilles  
mimétiques du Pérou (Dendrobatidae)**

par

Mathieu Chouteau

Département des Sciences Biologiques

Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

En vue de l'obtention du grade de Ph.D.

En Sciences Biologiques

Été 2011

© Mathieu Chouteau, 2011

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Sélection et polymorphisme chez des grenouilles mimétiques du Pérou (Dendrobatidae)

Présentée par:

Mathieu Chouteau

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Jacques Brodeur, président-rapporteur

Bernard Angers, directeur de recherche

Frédérique Dubois, membre du jury

David Green, examinateur externe

Jacques Brodeur, représentant du doyen de la FESP

## Résumé

La diversification des signaux aposématiqués dans un cadre de mimétisme müllérien est un phénomène intrigant. Alors que la théorie relative à l'aposématisme et au mimétisme suggère l'évolution vers un signal aposématique unique, d'impressionnantes variations peuvent être observées entre les populations, et cela à petite échelle spatiale. Il a été supposé que la variation spatiale des pressions de sélection engendrées par différents prédateurs puisse être à l'origine de ce phénomène.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié la transition entre deux systèmes géographiques caractérisés par des patrons aposématiques distincts chez des grenouilles mimétiques et toxiques du nord du Pérou (Dendrobatidae) en combinant les outils de génétique des populations aux outils écologiques. Dans chacun de ces systèmes, *Ranitomeya imitator* vit en sympatrie avec *R. ventrimaculata* ou *R. variabilis*. Il s'agit du principal exemple empirique suggérant que dans un cadre de mimétisme müllérien, il n'y a pas convergence des signaux aposématiques des deux espèces, mais plutôt convergence unidirectionnelle où *R. imitator*, étant polymorphe, imite des espèces monomorphes avec lesquelles elle est sympatrique.

Premièrement, les résultats réfutent les prémisses qui suggèrent que *R. imitator* converge vers le signal aposématique d'une autre espèce. La haute similarité génétique entre les espèces modèles suggère qu'elles ont divergé plus récemment que les populations de *R. imitator* ou qu'elles sont encore connectées par du flux génique. Ces résultats indiquent que ces espèces ont été identifiées à tort comme des espèces différentes. De fait, l'identification de l'espèce imitatrice basée sur la variabilité phénotypique est invalidée dans ce système puisque *R. imitator* et *R. variabilis/ventrimaculata* démontrent la même variabilité.

Deuxièmement, nos résultats démontrent que la prédation varie spatialement, autant en intensité qu'en direction, créant ainsi un paysage hétérogène de pressions de sélection. Ainsi, de fortes pressions de prédation stabilisatrice permettent le maintien de l'organisation géographique de différents signaux aposématiques et expliquent l'uniformité

de ces signaux ainsi que les relations mimétiques. Par contre, le relâchement temporaire des pressions de prédation permet l'apparition de nouveaux phénotypes aposématiques via les processus évolutifs neutres, conduisant à un haut polymorphisme au niveau de ces populations. L'interaction de ces modes sélectifs nous a permis de démontrer pour la première fois comment la théorie évolutive de Wright (*shifting balance theory*) permet la diversification adaptative dans un système naturel.

Pour conclure, cette étude a permis de mettre en évidence à quel point les systèmes de mimétisme müllérien peuvent être dynamiques. L'alternance spatiale entre les processus évolutifs neutres et la sélection naturelle permet l'émergence de nouveaux phénotypes aposématiques à une échelle locale, ainsi que l'apparition d'une organisation géographique des signaux d'avertissement et des relations de mimétisme müllérien.

**Mots-clés:** Aposématisme, mimétisme, polymorphisme, *Ranitomeya*, advergence phénotypique, structure spatial, prédation, diversification.

## Abstract

The diversification of aposematic signals in Müllerian mimicry systems is a puzzling phenomenon. Although aposematism and mimicry are expected to promote uniformity in warning signals, impressive variations may be observed among populations at relatively small spatial scales. It has been suggested that spatial variation in selective pressures caused by predators might be responsible for this phenomenon.

In order to test this hypothesis, we studied the transition in the aposematic signals of the mimetic poison-dart frogs of Northern Peru (Dendrobatidae) between two geographical systems characterized by distinct aposematic signals. This was done by combining population genetics and ecological tools. In both systems, *Ranitomeya imitator* is sympatric with either *R. ventrimaculata* or *R. variabilis*. This system is recognized as a rare example in support of the hypothesis for advergence: *R. imitator*, which is polymorphic, is believed to mimic distinct sympatric monomorphic model species.

However, our results do not support the hypothesis for advergence of the aposematic signals by *R. imitator*. The genetic similarity between the model species suggests that they have diverged more recently than *R. imitator* populations or that they are still connected by gene flow. These results indicate that these species were misidentified as being different species. As such, the identification of the mimetic species based on phenotypic variability is invalidated in this system, since *R. imitator* is as variable as *R. variabilis/ventrimaculata*.

Also, our results demonstrate that predation pressure is spatially variable, in both intensity and direction, thus creating a heterogeneous selective landscape. As such, strong and directed stabilizing selective pressures maintain the geographic organisation of aposematic signals and explain phenotypic uniformity and mimetic relationships. Relaxation of these selective pressures enables for the appearance of novel aposematic phenotypes and promotes high phenotypic variability via neutral evolutionary processes. The interaction between these selective regimes has enabled us to demonstrate, and this for

the first time, how the Wright's *shifting balance theory* of evolution may promote adaptive diversification in a natural system.

In conclusion, this study highlights just how dynamic Müllerian mimicry systems can be. The interplay between neutral evolutionary processes and natural selection enables for the predominance of novel aposematic phenotypes at a local scale, and the geographical organisation of warning signals and Müllerian relationships.

**Keywords:** Aposematism, mimetism, polymorphism, *Ranitomeya*, phenotypic advergence, spatial structure, predation, diversification.

## Table des Matières

Résumé.....	i
Abstract .....	iii
Table des Matières .....	v
Liste des Tableaux .....	viii
Liste des Figures .....	ix
Liste des Sigles et Abréviations.....	xii
Remerciements .....	xv
Chapitre 1 .....	1
Introduction générale .....	1
1.1 L'aposématisme.....	2
1.2 Le mimétisme .....	4
Mimétisme müllérien.....	5
Mimétisme müllérien: mécanismes .....	5
Mimétisme müllérien: qui est le modèle et qui est l'imitateur? .....	7
1.3 Variation géographique des signaux aposématisques et relations mimétiques .....	8
1.4 Différentiation génétique des populations .....	9
Les mutations .....	10
La dérive génétique.....	10
La sélection naturelle .....	11
L'effet du flux génique .....	12
La phylogéographie .....	12
1.5 <i>Ranitomeya imitator</i> : cas problématique? .....	13
1.6 Objectifs.....	17
Chapitre 2 .....	20
The development and analysis of twenty-one microsatellite loci for three species of Amazonian poison frogs .....	20
Abstract.....	21
Microsatellite development.....	22



Acknowledgments .....	26
Chapitre 3 .....	27
Advergence in Müllerian mimicry: the case of the poison-dart frogs of Northern Peru revisited .....	27
Abstract.....	28
3.1 Introduction.....	29
3.2 Materials and methods.....	30
3.3 Results.....	31
3.4 Discussion .....	35
Acknowledgements .....	36
Chapitre 4 .....	37
The role of predators in maintaining the geographic organization of aposematic signals... 37	
Abstract.....	38
4.1 Introduction.....	39
4.2 Materials and methods.....	41
4.3 Results.....	44
4.4 Discussion .....	49
Acknowledgments.....	52
Chapitre 5 .....	53
Wright's shifting balance theory and the diversification of aposematic signals .....	53
Abstract.....	54
5.1 Introduction.....	55
5.2 Results.....	56
5.3 Discussion .....	61
5.4 Materials and Methods .....	65
Acknowledgements: .....	67
Chapitre 6 .....	69
Conclusion générale.....	69
Le développement de marqueurs génétiques microsatellites.....	69
Convergence ou advergence phénotypique chez <i>Ranitomeya</i> ? .....	70
Le rôle des prédateurs dans le maintien du polymorphisme géographique.....	72
La diversification des signaux aposématiques .....	73

Références .....	78
------------------	----

## Liste des Tableaux

**Table 2.1:** Microsatellite loci for *R. imitator* (Rimi) and *R. variabilis* (Rvar) including: primer sequence, repeat motif, annealing temperature ( $T_a$ ), observed size range of alleles in basepairs (bp), number of alleles, average observed population heterozygosity ( $H_o$ ), average expected population heterozygosity ( $H_E$ ), and GenBank Accession No.....24

**Table 3.1:** Genetic variability and differentiation estimated from nuclear and mitochondrial markers between populations of *Ranitomeya imitator* and the model species. The associated probabilities after 999 random permutations are indicated in parenthesis. Test for relevance of molecular information is included for both the nuclear loci and mitochondrial control region.\* Differentiation measured using the four loci displaying the lowest differentiation. ....33

**Table 4.1:** Test of Freeman-Tukey deviates in individual cells of contingency tables with the number of attacks over time for each model phenotype and for each site. Absolute values larger than the criterion with Bonferroni correction for 6 simultaneous tests (1.52) are in bold. These values identify the cells for which the number of observations significantly ( $p < 0.05$ ) differs (either higher or lower as shown by the sign) from the corresponding expected frequencies. \* indicates contingency tables for which the overall null hypothesis of complete independence of observations was not rejected.....47

**Table 4.2:** Test of Freeman-Tukey deviates in individual cells of contingency tables with the number of attacks for each model phenotype for every 24h observation and for all sites. Absolute values larger than the criterion with Bonferroni correction for 6 simultaneous tests (1.52) are in bold. These values identify the cells in which the number of observations significantly ( $p < 0.05$ ) differs (higher or lower as shown by the sign) from the corresponding expected frequencies. \* indicates contingency tables for which the overall null hypothesis of complete independence of observations was not rejected.....48

## Liste des Figures

- Figure 1.1:** Carte de répartition de *Ranitomeya imitator* et des espèces modèles: *Ranitomeya variabilis*, *Ranitomeya summersi* et *Ranitomeya ventrimaculata*. (D'après Simula et al. 2001).....14
- Figure 1.2:** Phylogramme montrant la topologie optimale ainsi que la longueur des branches provenant d'une analyse de maximum de vraisemblance des relations phylogénétiques (basé sur 4 locus mitochondriaux) entre *Ranitomeya imitator* et ses modèles: *Ranitomeya summersi* (anciennement appelé *R. fantastica* de la localité Sauce), *Ranitomeya variabilis* et *Ranitomeya ventrimaculata*. Image tirée de Symula et al. (2001). Il est à noter que le genre *Ranitomeya* était anciennement inclus dans le genre *Dendrobates*.....15
- Figure 3.1:** Map of the study area showing the localities under investigation and the phenotypes of the paired *Ranitomeya* species.....30
- Figure 3.2:** Genetic and phenotypic differences between the *Ranitomeya imitator* populations and between model species. A) Minimum spanning network inferred from the mitochondrial DNA haplotypes. Each box represents a distinct haplotype and its size refers to the relative abundance within populations. B) Individual assignment among  $K = 2$  clusters (black and white ) using STRUCTURE and, C) Frequency distribution of the different aposematic phenotypes (as colours and dorsal patterns) found within the different populations. The size of the circles represents the relative abundance of the phenotypes.....34
- Figure 4.1:** The two aposematic phenotypes of *Ranitomeya imitator* (upper row) and their respective clay models below (lower row, left and right), as well as a non conspicuous frog model (lower row, middle) used to measure predation rates.....43
- Figure 4.2:** Predation frequency on clay models representing a non conspicuous phenotype (brown) and two aposematic phenotypes of *Ranitomeya imitator* (green reticulated and

yellow striped) in two sites characterized by distinct aposematic signals. a) Frequency of predation attempts by avian (dark grey) and unknown predators (light grey) on the different models. b) Frequency of avian predation attempts as a function of time for each clay model phenotypes. ....45

**Figure 5.1:** Phenotypic variability, genetic diversity and predation pressure measured in *Ranitomeya imitator* for the study sites. (a) Topographic profile of the study system with the study sites along the 18 km transect. (b) Phenotypic variation within sites of both aposematic dorsal coloration and pattern measured using the Shannon diversity index. (c) Neutral genetic variation estimated from nine nuclear microsatellites loci in terms of expected heterozygosity and mean number of alleles per loci, and their associated standard deviation. (d) The predation of each aposematic signal measured as the percentage of clay models attacked by avian predators in each site. Probabilities associated to the within site G-test of independence are indicated above the bars and the sample size is indicated below.....58

**Figure 5.2:** Phenotypic distribution and genetic differentiation measured in *Ranitomeya imitator* for the study sites. (a) Frequency distribution of the different aposematic phenotypic coloration and dorsal patterns found among individuals in the four study sites. (b) Individual assignment among  $K = 2$  clusters using STRUCTURE and (c) the hierarchical partitioning of genetic variance between population groups estimated from nuclear microsatellites and mitochondrial control region; \* indicates a level of significance of  $p < 0.05$ . (d) Minimum spanning tree for mitochondrial control region haplotypes detected in this study. Each box refers to a distinct haplotype and the size represents its relative abundance.....60

**Figure 5.3:** Schematic representation of the diversification process of aposematic signals in *R. imitator*. The colored areas represent zones of high predation selecting distinct phenotypes and the grey area corresponds to a migration barrier for *R. imitator*. Individuals originating from the monomorphic yellow striped lowland populations (right) colonized (arrows) the transient zone (white area). Under the lowered predation pressure prevalent in these elevations, aposematic signals diversified due to genetic drift. Among the novel signals, the green reticulated phenotype which is recognized by predators (left) enabled the further colonization of the system, while other signals are highly counter selected (X).

Below the figure is a schematic representation of the relative intensity of selection compared to genetic drift.....64

**Figure 6.1:** Formation de la mosaïque spatiale des signaux aposématiqués présentée par Sherratt (2006). Les populations d'une espèce aposématique, démontrant 10 phénotypes, sont distribuées aléatoirement dans une grille (50 x 50 cellules). À chaque génération, les individus peuvent se disperser (à un faible taux) dans les cellules adjacentes, la communauté de prédateurs local élimine un nombre déterminé de chacun des phénotypes dans chacune des cellules jusqu'à atteindre un seuil où le phénotype est évité, et les proies se reproduisent. Bien que débutant avec une distribution aléatoire des phénotypes aposématiqués, une structure spatiale des signaux aposématiqués apparaît rapidement. Figure modifiée de Sherratt (2006).....76

## Liste des Sigles et Abréviations

ADN (DNA): Acide désoxyribonucléique

Bp: Paire de bases

C.I.: Intervalle de confiance

$F_{CT}$ : Indice de diversité entre groupes de populations

$F_{SC}$ : Indice de diversité à l'intérieur d'un groupe de populations

$F_{ST}$ : Indice de diversité inter-populations

FT: Statistique de Freeman-Tukey

$H'$ : Indice de diversité de Shannon

$H_D$ : Diversité haplotypique

$H_E$ : Diversité génétique de Nei ou hétérozygotie attendue sous équilibre de Hardy-Weinberg

$H_O$ : Fréquence d'hétérozygotes observée

HSB: Hue/Saturation/Brightness

IAM: Modèle de mutations à infinité d'allèles

K: Nombre de partitions

LST: Théorie évolutive de la population de grande taille

MCMC: Simulation de Monte-Carlo de chaîne de Markov

mtDNA: ADN mitochondrial

nDNA: ADN nucléaire

PCR: Réaction en chaîne polymérase

$R_{CT}$ : Indice de diversité entre groupes de populations prenant en compte la taille des microsatellites

$R_{SC}$ : Indice de diversité à l'intérieur d'un groupe de populations prenant en compte la taille des microsatellites

$R_{ST}$ : Indice de diversité inter-populations prenant en compte la taille des microsatellites

s.d.: Erreur standard

SBT: Théorie évolutive du shifting balance

SMM: Modèle de mutations pas à pas

SSCP: Polymorphisme de conformation par simple brin

$T_a$ : Température d'hybridation

$W$ : Statistique de Levene

$\Phi_{CT}$ : Indice de diversité moléculaire entre groupes de populations

$\Phi_{SC}$ : Indice de diversité moléculaire à l'intérieur d'un groupe de populations

$\Phi_{ST}$ : Indice de diversité moléculaire inter-populations





## Remerciements

Je tiens avant tout à remercier mon directeur de recherche, Bernard Angers, pour sa confiance et son impeccable direction tout au long de cette thèse. Bernard a merveilleusement su me donner la liberté nécessaire pour exprimer mes nombreuses idées et donner libre cours à mes motivations, tout en veillant à ce que je ne m'égare pas en chemin. Sous sa direction, mes études doctorales ont été merveilleuses, tant au niveau scientifique que sur le plan social et culturel.

Merci aussi aux étudiants du laboratoire pour leur soutien indéfectible, mais également pour tous les bons moments passés avec eux durant ces quatre dernières années. J'aimerais notamment remercier Frédéric Cyr, Rachel Massicotte, Daniel Cossios, Méloée Prud'homme, Christelle Leung, Benoit Talbot, Martin Laporte et Francis Vallières.

Je voudrais également exprimer ma gratitude à Kyle Summers, Mathieu Joron, Victor Morales, Philippe Cerdan, Marc Gibernau, Louis Coloma et Lou Jost qui m'ont accueilli lors de formations à l'étranger. Non seulement ils ont partagé leur savoir avec moi, mais ils m'ont également permis de découvrir des lieux incroyables au Pérou, en Équateur et en Guyane Française.

Réaliser un projet de recherche au Pérou n'aurait jamais été possible sans la précieuse aide de Daniel Cossios, Jason Lee Brown, Mark Pepper, Manuel Sanchez, Evan Twoney et Justin Yeager. Un gros merci à vous tous! Je tiens aussi à remercier Cézard Lopez, Manuel Panaico et Jean-François Brousseau pour leur assistance inestimable lors des échantillonnages qui ont été réalisés dans des conditions très rudes.

Je ne pourrais, avec des mots, exprimer l'amour que je porte à mes parents, à mon frère et à mes grands-parents. Merci pour votre appui tout au long de ma vie. Un merci très particulier aussi à mon grand-père paternel, René, qui a cru en moi dès le début. Tu n'es plus là, Papy, mais je n'oublie pas tout ce que je te dois. Merci également à Melanie McClure, mon amour, pour sa présence constante à mes côtés dans les meilleurs comme dans les pires moments.

Ce projet de recherche aura été financé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), le Ministère de l'Éducation et des Loisirs du Québec (MELS), le Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), le Groupe de recherche interuniversitaire en limnologie et en environnement aquatique (GRIL). J'ai été personnellement financé par des bourses du CRSNG, du département des Sciences Biologiques et de la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales. Je tiens finalement à remercier le gouvernement péruvien pour m'avoir accordé les permis scientifiques nécessaires à ma recherche.

# Chapitre 1

## Introduction générale

Après avoir observé au Brésil de nombreuses espèces de papillons néo-tropicaux présentant des similarités au niveau des patrons de coloration, Henry Walter Bates (1862) a émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'un exemple de sélection naturelle où les espèces comestibles ressemblent aux espèces toxiques afin d'acquérir une protection contre les prédateurs. Cette situation fut plus tard appelée mimétisme batésien. Bates documenta également un nombre de cas où plusieurs espèces, toutes toxiques, se ressemblaient entre elles. Étant donné qu'être toxique confère une protection face aux prédateurs, il suggéra que la convergence de ces phénotypes devait être causée par une adaptation similaire aux mêmes conditions abiotique de l'environnement. Le naturaliste Johannes Friedrich Müller qui, lui aussi, travaillait au Brésil a fait les mêmes constatations et a publié 16 ans après Bates une explication à la similarité phénotypique observée entre différentes espèces toxiques. L'explication de Müller (1878) était extrêmement simple: "des espèces pourvues de défenses se ressemblent et partagent ainsi les coûts de l'éducation des prédateurs" (mimétisme müllérien). Bien qu'à première vue, les avantages conférés aux espèces mimétiques soient clairs, les mécanismes évolutifs permettant d'atteindre cette situation restent nébuleux et sujets à de nombreuses controverses.

Afin de comprendre le thème de cette thèse, les théories associées aux phénomènes de l'aposématisme et du mimétisme müllérien seront présentées. Cela permettra de bien cibler les problématiques abordées, soit la controverse associée à la direction des relations mimétiques entre les espèces et les problèmes théoriques découlant de la diversification des signaux aposématiques. Les notions clés ayant trait à la diversification génétique des populations, ainsi que le modèle biologique choisi, soit la petite grenouille tropicale *Ranitomeya imitator*, seront finalement présentés avant d'aborder les objectifs.

## 1.1 L'aposématisme

L'aposématisme est une stratégie adaptative qui permet à certains organismes de se prémunir d'un signal d'avertissement clairement perceptible par les prédateurs potentiels, afin de les avertir qu'ils représentent un danger et qu'ils doivent être évités. Cette stratégie serait donc bénéfique pour la proie comme pour le prédateur. Bien que plusieurs types de signaux d'avertissement aient été documentés (i.e. coloration, odeur, signal sonore; Ruxton et al. 2004), la coloration vive en relation avec la toxicité de certains organismes est un modèle qui a retenu l'attention des scientifiques.

L'efficacité d'un signal aposématique dans un habitat dépend de deux facteurs: la capacité cognitive du prédateur et l'abondance du signal. Ainsi, il est essentiel que le prédateur ait la faculté d'associer la coloration au danger, afin que ce dernier évite ce type de signal (Ruxton et al. 2004; Mappes et al. 2005). Le fait d'éviter un signal est généralement une réponse basée sur l'expérience, bien que dans certains cas il s'agisse d'une réponse innée (Pough 1988; Ruxton et al. 2004).

De plus, l'efficacité d'un signal aposématique dans un habitat est directement proportionnelle à sa fréquence (Sherratt 2008). Ainsi, lorsque le signal aposématique est fréquent dans un habitat, il est facile de comprendre qu'il représente une stratégie évolutive avantageuse: une petite proportion de la population sera tuée et les prédateurs apprendront rapidement à éviter le signal. Ainsi, le taux de survie *per capita* d'un signal aposématique abondant sera relativement élevé. Par contre, lorsque le signal est rare, il est difficile de comprendre en quoi il serait avantageux. Ceci est principalement dû au fait qu'une proie aposématique rare devrait être sujette à une mortalité *per capita* élevée, étant donné qu'une grande proportion, voire la totalité de la population de proies sera tuée lors de la période d'apprentissage des prédateurs (Lindstrom et al. 2001a; Speed 2001).

D'un point de vue évolutif, plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'apparition de l'aposématisme chez un organisme. Une première hypothèse est qu'un signal aposématique serait apparu suite à une mutation chez une espèce cryptique ayant déjà des moyens de défense (Ruxton et al. 2004). Ce scénario pose tout de même certains problèmes (Mallet & Singer 1987; Mallet & Joron 1999). Premièrement, les individus aposématiques (i.e. ayant perdu l'avantage conféré par la coloration cryptique) seront par

définition plus visibles pour les prédateurs qui ignorent ce nouveau signal d'avertissement et ils seront par conséquent plus à risque de prédation. Deuxièmement, la nouvelle mutation aposématique étant au départ extrêmement rare, celle-ci peut disparaître plus rapidement en raison de la prédation, mais également de la dérive génétique. Dans ce contexte, plusieurs scénarios basés sur la chance ont été suggérés afin d'expliquer comment un nouveau phénotype aposématique peut augmenter en fréquence dans un habitat.

- a- L'absence temporaire de prédateurs dans l'habitat pourrait permettre à un signal aposématique rare d'augmenter en fréquence jusqu'à atteindre une fréquence seuil où il deviendra avantageux (Mallet & Singer 1987; Mallet & Joron 1999).
- b- Les prédateurs peuvent être conservateurs dans leur diète (Thomas et al. 2003; Ruxton et al. 2004). Par exemple, les oiseaux (i.e. prédateur modèle utilisé lors des expériences sur les signaux aposématiques) semblent démontrer une grande variabilité dans le niveau de conservatisme de leur diète (Marples et al. 1998), suggérant que la survie des mutants aposématiques peut être hétérogène dépendamment du type de prédateur rencontré dans l'habitat. Ainsi, si une forme rare aposématique apparaît dans un habitat « sécuritaire » où les prédateurs ont une diète conservatrice, elle pourra alors augmenter sa fréquence (Thomas et al. 2003).
- c- Les prédateurs, par chance, ne rencontrent pas le rare phénotype aposématique et celui-ci verra sa fréquence augmenter au fil des générations. Bien que ce scénario soit très improbable, certains modèles théoriques ont suggéré qu'il pouvait tout de même survenir (Speed 2001; Sherratt & Beatty 2003).

Certains auteurs ont suggéré que le signal aposématique pouvait apparaître à la suite d'autres mécanismes. Parmi les hypothèses, il a été proposé que le signal aposématique puisse avoir également le rôle de trait sexuel dans un cadre de sélection sexuelle (Mallet & Singer 1987). Ainsi, la mutation aposématique pourrait être avantageuse dès son apparition si le bénéfice conféré par la sélection sexuelle est plus élevé que le désavantage occasionné par la prédation. Également, comme dans le cas de la sélection sexuelle, le signal aposématique pourrait apporter à l'organisme d'autres bénéfices. Particulièrement lorsque l'aposématisme permet d'élargir l'utilisation des opportunités offertes par l'environnement

comparativement à un phénotype cryptique, comme la thermorégulation, l'acquisition de nourriture et la recherche de partenaire sexuel (Abrams 1991; Stamp & Wilkens 1993). Bien que cette dernière hypothèse permette d'élucider les raisons du maintien de la coloration vive, elle ne permet pas d'expliquer son évolution initiale.

Ces scénarios (à l'exception de la sélection sexuelle) suggèrent que l'augmentation initiale d'un nouveau phénotype aposématique dans une population ne pourra être possible que par les effets conjoints des mutations et de la dérive génétique, vraisemblablement combinée à une diminution de l'impact de la prédation. En effet, étant initialement désavantageux (i.e. plus facilement détectable et non évité par les prédateurs) et en l'absence d'autres formes de sélection favorisant ce trait, seul l'effet stochastique de la dérive génétique pourrait permettre l'augmentation en abondance du phénotype au fil des générations. Une diminution de la prédation aurait comme effet de faciliter cette éventuelle augmentation puisque les nouveaux mutants aposématiques seraient moins contre-sélectionnés, permettant ainsi un meilleur transfert des mutations responsables de l'aposématisme aux prochaines générations. Par contre, lorsque le phénotype aposématique devient suffisamment abondant pour permettre l'éducation des prédateurs, celui-ci deviendra alors avantageux. Ainsi, cette mutation initialement désavantageuse aura tendance à se fixer dans la population plus rapidement en raison des pressions de prédation qui la favoriseront.

## **1.2 Le mimétisme**

Le mimétisme batésien et müllérien sont deux phénomènes découlant obligatoirement de l'aposématisme. Le mimétisme survient lorsque plusieurs espèces démontrent le même signal d'avertissement dans une même aire géographique. Le mimétisme le plus répandu est le mimétisme batésien où une espèce sans défense, sous l'effet de la sélection, verra son phénotype converger vers le signal d'avertissement d'une espèce aposématique. Ce faisant, elle profite de la protection contre les prédateurs qui ont appris à se méfier du signal aposématique. Ce type de relation peut être considéré comme « parasitique » pour l'espèce

aposematique, car son signal d'avertissement est ainsi dilué par les individus non toxiques (Ruxton et al. 2004). Afin qu'une telle relation mimétique soit efficace, il est proposé que les espèces imitatrices doivent être moins abondantes que les espèces modèles afin que les prédateurs n'associent pas le signal d'avertissement à une proie comestible (Ruxton et al. 2004). Le second type de mimétisme, le mimétisme müllérien, met en relation deux ou plusieurs organismes toxiques qui, dans un habitat, démontreront le même phénotype aposématique. Cette relation mimétique est intéressante car, *a priori*, chacune des espèces a les défenses nécessaires pour se protéger des prédateurs et ainsi ne devrait pas nécessiter la protection d'une autre espèce (Sherratt 2008).

### **Mimétisme müllérien**

Le mimétisme müllérien a été documenté chez une diversité d'organismes, bien que ce soit chez les insectes, plus particulièrement les lépidoptères, qu'il ait été le plus étudié. L'exemple le plus célèbre est celui des papillons du genre *Heliconius* (Sheppard et al. 1985; Brower 1996), où plusieurs espèces démontrent le même phénotype aposématique qui est également adopté par de nombreux mimes batésiens. D'autres cas fascinants ont été documentés chez d'autres lépidoptères (Niehuis et al. 2007), les hyménoptères (Williams 2007) et les hétéroptères (Zrzavy & Nedved 1999). Bien que le mimétisme müllérien semble beaucoup plus rare chez les vertébrés, il a tout de même été documenté chez les anoures (Symula et al. 2001; Chiari et al. 2004), les serpents (Sanders et al. 2006), les poissons (Randall 2005) et les oiseaux (Dumbacher & Fleischer 2001).

### **Mimétisme müllérien: mécanismes**

On convient que le mimétisme müllérien soit apparu en raison des pressions exercées par les prédateurs (Ruxton et al. 2004). Müller (1878), lorsqu'il a décrit pour la première fois le phénomène, a inclus un modèle mathématique simple permettant de calculer les bénéfices de ce phénomène en comparant le taux de survie, au sein des populations, d'une paire d'espèces existant avec ou sans mimétisme.



*Si  $a_1$  et  $a_2$  sont les effectifs de deux espèces aposématiqués dans un même habitat, et  $n$  est le nombre d'individus de chaque espèce distincte qui seront détruits par les prédateurs avant que ceux-ci apprennent à reconnaître le signal. Alors, si les deux espèces ont des signaux aposématiqués différents, chaque espèce perdra  $n$  individus. Par contre, si elles adoptent le même signal aposématique (i.e. que le prédateur ne peut distinguer), alors la première espèce perdra  $a_1 n / (a_1 + a_2)$  individus et la seconde en perdra  $a_2 n / (a_1 + a_2)$ .*

Ce modèle explique que deux espèces ayant le même signal aposématique auront un plus haut taux de survie *per capita* que si elles adoptent des signaux aposématiqués distincts. Ceci est dû au fait que le coût associé à l'éducation des prédateurs, qui éliminent un nombre déterminé de chaque forme aposématique avant d'apprendre à reconnaître et éviter le signal, est réparti entre les deux espèces. Comme pour la théorie relative au signal aposématique vue auparavant, lorsque deux signaux aposématiqués coexistent dans un même habitat, et qu'un de ces signaux est plus rare, celui-ci aura tendance à subir un plus haut taux de prédation *per capita*. Aussi, selon le modèle, plus les effectifs des espèces du système mimétique seront nombreux, plus le système sera efficace, car la prédation *per capita* sera plus faible (i.e. la force est dans le nombre).

Mallet (1999) a raffiné le modèle de Müller (1878) en y incluant la variation du degré de défense entre les espèces d'un système de mimétisme. Selon ce modèle, il est assumé que les proies contiennent une dose de toxine et que la population de prédateurs apprendra à reconnaître et éviter entièrement une proie lorsqu'elle aura consommé un seuil limite de toxine, plutôt qu'un nombre déterminé d'individus. Ainsi, moins d'individus très toxiques d'une espèce seront consommés avant que les prédateurs évitent l'espèce.

Les expériences réalisées sur les lépidoptères sur le terrain ont confirmé que la prédation est plus importante sur les formes aposématiqués moins communes (Mallet & Barton 1989; Kapan 2001) ou nouvelles (Pinheiro 2003). Il a aussi été démontré que la coexistence de formes aposématiqués était possible lorsque les prédateurs sont rares dans l'habitat (Mallet & Barton 1989) ou encore lorsque les fréquences des différentes formes sont suffisamment grandes pour permettre au prédateur d'apprendre à reconnaître les différents signaux (Mallet & Joron 1999). Bien que jusqu'à maintenant, il n'a jamais été démontré expérimentalement que les prédateurs attaquent un nombre déterminé de chaque

forme aposématique, ou absorbent une dose critique de toxine, avant d'apprendre à reconnaître le signal et à l'éviter (Greenwood et al. 1989; Lindstrom et al. 2001b; Beatty et al. 2004), ceci serait attribuable à certaines contraintes expérimentales, la principale étant que la durée des expériences ne permettrait pas aux prédateurs d'apprendre à éviter les signaux (Ruxton et al. 2004).

### **Mimétisme müllérien: qui est le modèle et qui est l'imitateur?**

La question à savoir qui est l'espèce modèle est celle imitatrice dans un système de mimétisme müllérien est sûrement celle qui a le plus préoccupé les scientifiques. Actuellement, aucune étude n'a pu clairement y répondre. Évidemment, il est envisageable que les différentes espèces dans un complexe de mimétisme müllérien puissent être considérées comme des "co-imitatrices", particulièrement s'il existe une forme de convergence des phénotypes entre les espèces. Cette théorie a été féroceement défendue par Müller qui disait (traduction): « Essayer de définir laquelle des deux espèces est l'original et laquelle est le modèle est une question hors de propos. Chacune des espèces a avantage à devenir identique à l'autre, et de fait, elles ont pu converger l'une vers l'autre ». Par contre, une autre théorie concevable est qu'une seule des deux espèces, sous l'effet de la sélection verra son phénotype changer au fil des générations jusqu'à ressembler à l'autre espèce (i.e. advergence phénotypique; Mallet 2001) comme dans le cas du mimétisme batésien. Bien que cette dernière théorie ait été très critiquée par le passé, certaines données empiriques récentes semblent confirmer cette théorie qui est actuellement acceptée. Ce revirement de pensée récent découle du cas documenté de *Ranitomeya imitator*, une petite grenouille toxique, qui sous l'effet de la sélection, ressemblerait à différentes espèces modèles dans des aires géographiques distinctes (Symula et al. 2001). Il a aussi été supposé par Mallet (1999) et Flanagan et al. (2004) que cette situation survient chez certains lépidoptères (e.g. papillon vice-roi (*Limenitis archippus*) imitant le Monarque; *Heliconius melpomene* imitant *H. erato*). Ces potentiels cas d'advergence phénotypique ont principalement été identifiés en utilisant une liste de caractéristiques suggérées par Mallet et al. (1999) permettant de reconnaître l'espèce modèle. Selon cette liste, on s'attend à ce que l'espèce modèle soit: 1) plus toxique, 2) plus abondante, 3) plus voyante. Elle devrait également 4) avoir une plus grande distribution géographique, 5) un patron de coloration plus ancestral, 6) moins de polymorphisme et 7) moins de divergences du patron ancestral par rapport à son imitateur.

### 1.3 Variation géographique des signaux aposématiqués et relations mimétiques

Bien qu'une espèce aposématique ait généralement un seul signal aposématique dans un habitat, certaines espèces démontrent une grande variabilité d'un habitat à l'autre. Ceci a particulièrement bien été documenté chez les papillons mimétiques *Heliconius erato* et *H. melpomene* qui sont localement monomorphes et se ressemblent, mais possèdent plus de 30 différents phénotypes localisés au sein de leur aire de répartition (Brower 1996; Jiggins & McMillan 1997; Flanagan et al. 2004). Une telle mosaïque spatiale de signaux aposématiqués semble paradoxale puisque ces caractères sont soumis à de fortes pressions de sélection stabilisatrice, et de fait ne devraient pas se diversifier. Pourtant, comme le montrent les expériences de Mallet & Barton (1989), la coexistence de signaux aposématiqués serait possible en l'absence de sélection par les prédateurs. Bien que cette théorie n'ait jamais été démontrée de façon empirique, il a été supposé que si les pressions de sélection sont absentes pendant une longue période (e.g. plusieurs milliers de générations), la combinaison résultant de l'accumulation de nouveaux allèles aposématiqués par mutation, leur éventuelle augmentation en fréquence par dérive génétique et l'apparition d'individus ayant de nouvelles combinaisons d'allèles pourrait générer le polymorphisme (Mallet et al. 1996). À une échelle temporelle beaucoup plus courte, l'hybridation de populations fixées pour des allèles distincts peut résulter en une zone d'hybridation polymorphe (Garant et al. 2007) où les hybrides sont fortement contre-sélectionnés et géographiquement restreints à une mince région située entre les populations mères (Mallet & Barton 1989).

Bien que les mécanismes de diversification des signaux aposématiqués soient mal compris, la formation d'une mosaïque spatiale stable serait la conséquence directe d'une sélection fréquence-dépendante localisée (Joron & Iwasa 2005; Sherratt 2006). En effet, les simulations effectuées par Sherratt (2006) ont démontré qu'à partir d'une situation initiale de polymorphisme, dans laquelle plusieurs formes aposématiqués de une ou deux espèces (les mêmes phénotypes sont présents dans les deux espèces) sont distribuées aléatoirement sur une aire géographique, une mosaïque géographique de cellules monomorphes pouvait

se former uniquement en raison d'une sélection forte sur les phénotypes aposématiques localisés et cela sans la présence de barrières géographiques. Le phénotype dominant d'une cellule de la mosaïque sera principalement déterminé par le phénotype le plus abondant initialement (effet de chance provenant de la répartition initiale). Une telle sélection résultera en une situation où les communautés de prédateurs de localités différentes reconnaîtront et éviteront des signaux aposématiques distincts tout en contre-sélectionnant fortement les nouveaux signaux et les signaux exotiques. Plusieurs études ont démontré la capacité des prédateurs à discriminer entre différents signaux aposématiques: les signaux locaux sont avantagés par rapport aux signaux exotiques (Benson 1972; Mallet & Barton 1989; Kapan 2001; Pinheiro 2003; Harper & Pfennig 2007; Noonan & Comeault 2009; Borer et al. 2010; Kikuchi & Pfennig 2010). Il a même été démontré que de telles pressions de sélection pouvaient provoquer la divergence des populations et même la spéciation (Jiggins et al. 2001).

#### **1.4 Différentiation génétique des populations**

À partir du moment où les signaux aposématiques ont une base génétique et qu'ils sont structurés géographiquement, cela implique une différenciation génétique des populations. Sur l'ensemble de l'aire de distribution de la majorité des espèces, les individus ne se reproduisent pas aléatoirement. Au contraire, ils auront tendance à s'accoupler plus fréquemment avec ceux qui sont à proximité, qui se reproduiront en même temps ou qui occuperont des milieux similaires. La forte sélection stabilisatrice localisée effectuée par les prédateurs sur les espèces aposématiques devrait avoir tendance à contraindre la migration entre les populations, ainsi celles-ci auront tendance à évoluer de manière indépendante via les mutations, la dérive génétique et la sélection, et acquerront un bagage génétique différent, créant ainsi une subdivision de l'espèce en populations arrangées spatialement (Excoffier 2001):

## Les mutations

Les mutations correspondent à des changements dans une séquence d'ADN par substitution, délétion ou insertion de nucléotides survenant lors d'erreurs de réplifications du matériel génétique. Les mutations représentent la source de variation fondamentale et permettent d'engendrer de nouveaux allèles. Ces nouveaux allèles apparaîtront de façon indépendante dans les différentes populations et seront soumis à la dérive génétique et potentiellement à la sélection (Halliburton 2004).

Le taux de mutation (i.e. probabilité d'apparition d'un type donné de mutation par génération) variera en fonction du type de mutation ainsi que du type de séquence dans lequel celle-ci se produit. Par exemple, pour le génome nucléaire, les mutations géniques synonymes ( $10^{-9}$  mutation/nucléotide/génération) sont plus fréquentes que les mutations non-synonymes ( $10^{-10}$  mutation/nucléotide/génération; Li 1997) mais tout de même bien moins fréquentes que les mutations sur les séquences microsatellites ( $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  mutation/allèle/génération; Weber & Wong 1993).

## La dérive génétique

Le nombre d'individus composant une population étant fini, l'échantillonnage aléatoire des gamètes de ces derniers lors de la formation de la génération suivante, font que les fréquences alléliques peuvent varier d'une génération à l'autre par la seule force du hasard (Wright 1931; Halliburton 2004). Ce phénomène, nommé dérive génétique, est le principal processus de différenciation des populations puisqu'il agit sur l'ensemble des locus de manière indépendante et peut permettre à une population de prendre différentes directions évolutives. Ce processus stochastique empêche la prédiction exacte de l'évolution des fréquences alléliques d'une génération à l'autre. Par contre, il est possible de simuler les effets de la dérive en fonction des fréquences alléliques actuelles (Fisher 1930; Wright 1931). Il ressort du modèle de Wright-Fisher que plus un allèle est fréquent, plus il est probable qu'il soit fixé au fil des générations et inversement, plus un allèle est rare, plus les chances sont grandes qu'il disparaisse. Finalement, l'intensité de la dérive est inversement proportionnelle à la taille efficace de la population (taille d'une population idéale théorique ayant un degré de dérive génique similaire à la population étudiée). Ainsi,

plus une population aura des effectifs restreints et plus les allèles se fixeront ou seront perdus rapidement.

### **La sélection naturelle**

La sélection naturelle favorisera certains traits phénotypiques permettant aux individus les possédant de laisser plus de progéniture et ainsi de transmettre le matériel génétique responsable de ce phénotype. Les traits favorisés seront considérés comme adaptatifs et on dira alors que les individus les possédant ont une meilleure valeur adaptative (Krebs 2001). Les allèles codants pour ces traits avantageux seront transmis aux générations suivantes et augmenteront en fréquence au fil des générations au détriment des allèles codants pour des traits désavantageux, qui eux, disparaîtront avec le temps. Lorsque ces traits confèrent à une population une meilleure valeur adaptative dans un environnement déterminé, on parlera d'adaptation locale (Slatkin 1987). Le type d'adaptation locale résultant de la sélection naturelle mène à la distinction de différentes formes de sélection: certaines réduiront le polymorphisme tandis que d'autres le maintiendront. La divergence adaptative des populations est donc un phénomène pouvant survenir lorsque des populations dans différents environnements sont soumises à des pressions de sélection divergentes. Ce mécanisme laisse supposer que la divergence phénotypique entre les populations sera corrélée aux différentes conditions environnementales (i.e. pressions de sélection) auxquelles les individus sont soumis (Endler 1982a; Smith et al. 1997; Schneider & Moritz 1999; Schneider et al. 1999). Un exemple qui illustre bien ce cas de figure est une étude réalisée par Smith et al. (2001) qui démontre que des populations isolées allopatriquement, ayant divergé il y a relativement peu de temps et résidant dans des conditions environnementales différentes, démontrent des divergences phénotypiques plus grandes que des populations ou des espèces proches résidant dans des conditions environnementales similaires, ayant divergé il y a des millions d'années.

Dans le cas de l'aposématisme, lorsque le signal d'avertissement atteint une fréquence critique où celui-ci devient avantageux, la sélection naturelle favorisera l'allèle ou la combinaison d'allèles codants pour le signal le plus abondant, tandis que les autres

allèles disparaîtront: il s'agit d'une sélection dite purificatrice qui peut mener à la divergence adaptative des populations.

### **L'effet du flux génique**

Le niveau de différenciation génétique entre les populations sera fonction du flux migratoire qui les unit. Dans ce contexte, deux populations qui s'échangent régulièrement des migrants subiront une homogénéisation de leur composition génétique, effaçant ainsi les effets des précédentes forces pouvant être considérées comme divergentes (Halliburton 2004). Alors que très peu de flux génique est nécessaire pour contrer les effets de la dérive génétique, la divergence causée par la sélection en est moins dépendante et peut survenir en présence de flux génique (Wang 2004; Wright 1931). L'amplitude de la divergence sera alors fonction de la diversité génétique existante et de la force de la sélection (Garant et al. 2007). Les observations réalisées de façon empirique dans les milieux naturels ont documenté une relation inverse entre le degré de différenciation adaptative dans les traits phénotypiques entre les populations et le degré du flux génique (Sandoval 1994; King & Lawson 1995; Ross & Keller 1995; Smith et al. 1997; Storfer & Sih 1998; Lu & Bernatchez 1999; Hendry et al. 2002; Blondel et al. 2006).

### **La phylogéographie**

La structure génétique actuelle des populations est le résultat de facteurs évolutifs comme les mutations, la dérive, la sélection comme forces divergentes, et le flux génique comme processus conduisant à l'homogénéisation de la composition génétique (Avisé 2004). Cependant, la mise en place du bagage génétique modelé par ces processus résulte des facteurs historiques qui ont mené à la colonisation des différents milieux habités par les populations. L'interprétation des variations biologiques entre les populations ne peut se faire que dans un cadre où ces relations sont connues. Or, l'analyse du bagage génétique actuel des populations peut permettre la reconstruction des relations historiques qui les relient. Cette information, combinée à la distribution géographique des populations, se nomme phylogéographie (Avisé et al. 1987).

La phylogéographie est réalisée à l'aide de marqueurs génétiques neutres (non affectés par la sélection naturelle) permettant ainsi de conserver un signal évolutif qui n'est dû qu'à la dérive, aux mutations et à la migration. L'utilisation complémentaire de marqueurs sur différents génomes (e.g. mitochondriaux et nucléaires) combinés aux différences de taux de mutation des différents locus (substitutions synonymes, substitutions non synonymes, microsatellites) peut permettre d'identifier les processus de diversification sur une plus grande fenêtre temporelle (Halliburton 2004).

### 1.5 *Ranitomeya imitator*: cas problématique?

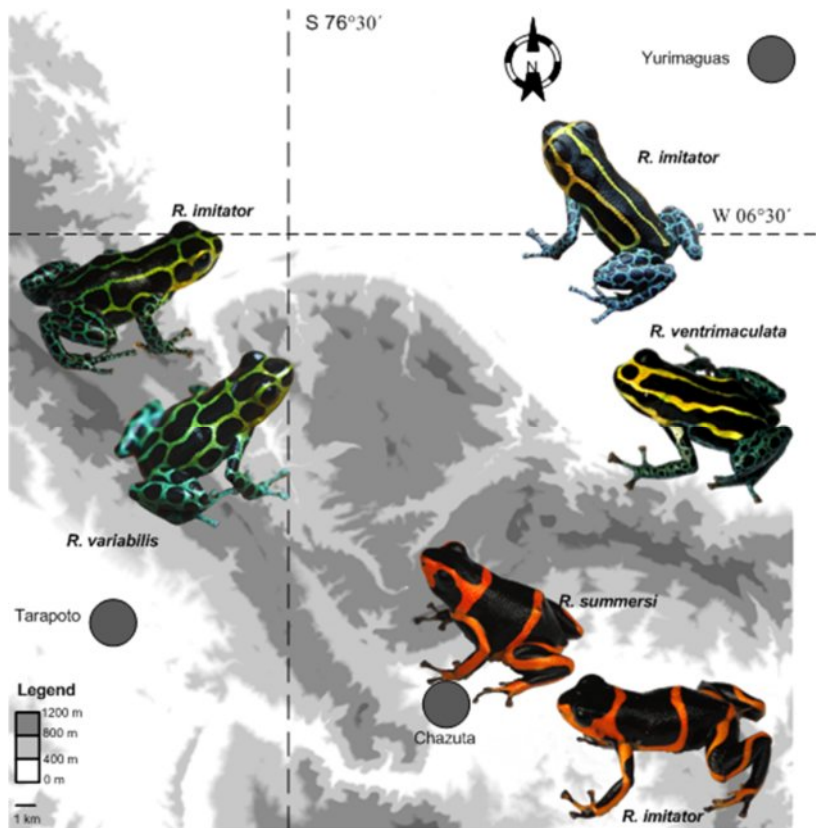
*Ranitomeya imitator* est une petite Dendrobatidae diurne. Cette espèce est largement répandue dans les forêts de basses terres et les zones d'altitudes intermédiaires que l'on trouve au pied des Andes dans les départements de San Martin et Loreto au Pérou. Cette petite grenouille a la particularité de posséder des patrons dorsaux et des colorations extrêmement variables et distincts entre les populations, et cela à l'échelle d'à peine quelques kilomètres (Symula et al. 2001). Dans les espèces du genre *Ranitomeya*, les patrons dorsaux et les couleurs vives représenteraient un signal aposématique afin d'avertir les prédateurs de leur grande toxicité (Symula et al. 2001). En effet, ces petites grenouilles peuvent sécréter des alcaloïdes cutanés neurotoxiques ayant le potentiel de faire régurgiter et même paralyser les prédateurs, probablement des oiseaux (Saporito et al. 2007; Noonan & Comeault 2008), les ayant mordues (Myers & Daly 1983).

Selon Symula et al. (2001), cette variation géographique rencontrée chez *R. imitator* serait engendrée par le mimétisme müllérien où *R. imitator* imite différentes espèces modèles. En effet, dans chaque cas, une population de *R. imitator* est sympatrique avec une population d'une autre espèce de *Ranitomeya* (i.e. *R. ventrimaculata*, *R. variabilis*, *R. summersi*) à laquelle elle ressemblera à s'y méprendre (Figure 1.1; Symula et al. 2001).

Dans les basses terres (moins de 300 m), près de Yurimaguas, *R. imitator* imite *Ranitomeya ventrimaculata* et a un patron de coloration caractérisé par des bandes longitudinales dorées sur fond noir. En altitude, dans la région de la vallée de Cainarachi, *R. imitator* est similaire à *Ranitomeya variabilis* et affiche un patron réticulé de couleur vert



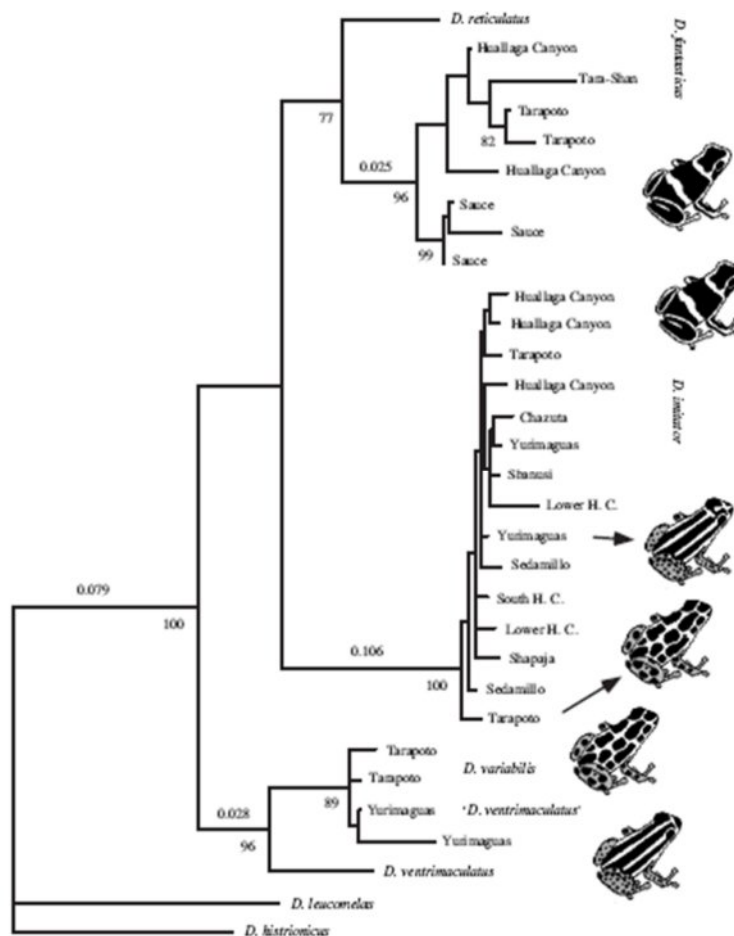
métallique sur fond noir. Finalement, sur la berge sud de la rivière Huallaga, près du village de Sauce, *R. imitator* a un patron dorsal de coloration identique à *R. summersi*, à savoir des bandes transversales jaunes-oranges sur fond noir.



**Figure 1.1:** Carte de répartition de *Ranitomeya imitator* et des espèces modèles: *Ranitomeya variabilis*, *Ranitomeya summersi* et *Ranitomeya ventrimaculata*. (D'après Simula et al. 2001).

Cette situation représenterait l'unique cas de radiation mimétique chez les amphibiens où une espèce imite l'apparence de plusieurs espèces distinctes (Simula et al. 2001) et un des rares cas de mimétisme müllérien chez les vertébrés (Sherratt 2008). Cette situation d'advergence phénotypique est actuellement le plus solide exemple appuyant l'hypothèse selon laquelle une espèce plus rare imiterait une plus commune et non vice-versa (comme ce serait le cas pour l'hypothèse des "co-imitateurs"). Afin de déterminer s'il s'agit d'un cas de radiation mimétique et si *R. imitator* est l'imitateur, Simula et al. (2001) ont démontré que les différentes formes de *R. imitator* vivant en sympatrie avec une

« espèce modèle » à laquelle elles ressemblent à s'y m'prendre forment un groupe monophylétique (Symula et al. 2001, voir Figure 1.2). Curieusement, il n'a été fait aucun test pour établir si les différentes espèces modèles étaient bien des espèces distinctes. D'autant plus qu'il est reconnu que les espèces de la famille des Dendrobatidae peuvent démontrer une grande variation phénotypique (Noonan & Gaucher 2006; Roberts et al. 2007; Rudh et al. 2007; Brown et al. 2008). Un cas d'intérêt particulier est la relation phylogénétique existant entre *R. ventrimaculata* et *R. variabilis* (Figure 1.2).



**Figure 1.2:** Phylogramme montrant la topologie optimale ainsi que la longueur des branches provenant d'une analyse de maximum de vraisemblance des relations phylogénétiques (basé sur 4 locus mitochondriaux) entre *Ranitomeya imitator* et ses modèles: *Ranitomeya sumersii* (anciennement appelé *R. fantastica* de la localité Sauce), *Ranitomeya variabilis* et *Ranitomeya ventrimaculata*. Image tirée de Symula et al. (2001). Il est à noter que le genre *Ranitomeya* était anciennement inclus dans le genre *Dendrobates*.

L'aire de distribution de *R. ventrimaculata* comprend les basses terres de la Guyane Française, du Brésil, de l'Équateur et du Pérou. Au Pérou, principalement dans le département de San Martin, *R. ventrimaculata* se distribue sur les pentes de la zone de transition Andes-Amazone (Twomey & Brown 2006) où elle vit en sympatrie avec *R. imitator* (Symula et al. 2001). Cette espèce est caractérisée par une morphologie et un patron de coloration conservés (patron dorsal en Y et membres réticulés), bien que la coloration (jaune, orange et rouge sur fond noir) et la taille (petites ou larges bandes) du patron puisse varier (Twomey & Brown 2006). *Ranitomeya variabilis*, distribuée dans la région de San Martin au Pérou à des altitudes supérieures à 500 m, a une morphologie très similaire à *R. ventrimaculata*, mais un patron de coloration vert réticulé. Bien que *R. ventrimaculata* et *R. variabilis* soient considérés comme des espèces distinctes, des études récentes ont démontré que *R. variabilis* est génétiquement similaire aux populations de *R. ventrimaculata* adjacentes (Symula et al. 2001; 2003). Le statut d'espèce de *R. variabilis* reste problématique et il a été suggéré que *R. variabilis* serait une forme de *R. ventrimaculata* vivant en altitude, bien que ces deux grenouilles aient des chants légèrement différents suggérant qu'il pourrait y avoir un isolement reproducteur. Le chant de *R. variabilis* aurait une fréquence plus basse que *R. ventrimaculata*, bien que les deux chants aient la même composition (Symula et al. 2003). Il est à noter que les patrons de répartition de ces deux espèces ne se recoupent pas. En effet, *R. ventrimaculata* est distribué exclusivement dans des altitudes inférieures à 300 m, tandis que *R. variabilis* se retrouve dans les vallées montagneuses et les plateaux à des altitudes de plus de 500 m (Jason Brown, communication personnelle). S'il s'avérait que certaines des espèces modèles de *R. imitator* soient en fait une espèce unique, cela pourrait remettre en cause la véracité de la radiation mimétique décrite par Symula et al. (2001).

Les données génétiques provenant du génome mitochondrial suggèrent que les populations de *R. imitator* seraient moins structurées que celles des espèces modèles (Symula et al. 2001). Bien que les analyses aient été réalisées chez un petit nombre d'individus (n=2 individus/population), ceci laisse penser que *R. imitator* se serait diversifié et aurait colonisé les différents habitats après ses modèles (Symula et al. 2001), supportant ainsi l'hypothèse de l'advergence phénotypique. Par contre, il n'a pas été pris en compte les différences de stratégies écologiques entre *R. imitator* et les espèces modèles. *Ranitomeya imitator* se retrouve dans des types de végétation variés comme les forêts inondées, les

forêts primaires, en bordure de routes ou de pâturages, du moment que des sites de reproduction soient disponibles. Les sites de reproduction consistent en des phytothelmes (i.e. récolte d'eau dans le creux des feuilles) de certaines plantes herbacées, tels les *Xanthosoma sp.*, *Dieffenbachia sp.* *Heliconia sp.* ainsi qu'en des récoltes d'eau au creux des troncs et branches des arbres. La grande variété de sites de reproduction utilisés par *R. imitator*, combinée à la variété d'habitats dans lesquels on la retrouve, permet de conclure qu'il s'agit d'une espèce généraliste. Par contre, les espèces modèles, soit *R. ventrimaculata*, *R. variabilis* et *R. summersii* sont des espèces résidant exclusivement dans les forêts primaires où des broméliacées épiphytes sont présentes (utilisées comme site de reproduction). Les forêts primaires où les broméliacées sont abondantes étant moins communes et dispersées, ces populations semblent relativement bien isolées les unes des autres. *Ranitomeya imitator* étant plus généraliste que ses espèces modèles, la connectivité entre les populations devrait être aussi plus élevée. Ceci pourrait expliquer la plus faible structure des populations de *R. imitator* documentée par Symula et al. (2001), indépendamment de la période de diversification/colonisation.

Une autre particularité d'intérêt de ce système est que, étrangement, dans les zones de transition entre deux signaux aposématiques fixés, *R. imitator* possède une très grande diversité de couleurs et de patrons dorsaux (observation personnelle). Une telle diversité de signaux aposématiques est inhabituelle et on peut s'attendre à une augmentation du taux de prédation, car il est plus difficile pour les prédateurs de reconnaître tous les signaux aposématiques. Une explication plausible de ce phénomène serait un relâchement des pressions de sélection sur le phénotype pouvant être dû à une absence de prédateurs. Cette situation inhabituelle permettrait de documenter, dans un système naturel, que les variations spatiales et éventuellement temporelles des pressions de sélection peuvent engendrer du polymorphisme aposématique.

## 1.6 Objectifs

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les processus sélectifs responsables du polymorphisme aposématique, en contrôlant pour les autres processus évolutifs neutres et la phylogéographie. Afin d'identifier ces processus, la grande diversité

de signaux aposématiques démontrée par *Ranitomeya imitator* entre les populations distinctes, mais aussi dans les zones de transition entre deux signaux, sera étudiée. Dans le système d'étude considéré, *R. imitator* est mimétique de deux espèces: soit *R. variabilis* dans les zones d'altitude et *R. ventrimaculata* dans les basses terres.

Dans un premier temps, afin de bien cibler le système d'étude, nous comptons clarifier la direction de la relation mimétique entre *R. imitator* et ses deux modèles. Ceci afin de déterminer si le polymorphisme aposématique de *R. imitator* peut être expliqué par le mimétisme müllérien, où *R. imitator* se serait diversifié afin de profiter de la protection des espèces modèles. Dans un second temps, les modèles théoriques expliquant l'organisation géographique des signaux aposématiques seront testés en milieu naturel. Ainsi, la capacité de différentes communautés de prédateurs à discriminer parmi différents signaux aposématiques sera testée afin de confirmer si les signaux locaux sont avantagés par rapport aux signaux exotiques. Finalement, nous tenterons de déterminer quels sont les mécanismes évolutifs menant à la diversification des phénotypes aposématiques. Le long du gradient altitudinal caractérisé par le changement de phénotypes aposématiques de *R. imitator*, les différents processus pouvant influencer le polymorphisme aposématique seront évalués afin d'avoir une vue d'ensemble du processus de diversification.

Cette thèse est ainsi caractérisée par 3 grandes questions:

**Question: *Ranitomeya imitator* a-t-il adopté les phénotypes d'espèces distinctes?**

Afin de répondre à cette question nous avons développé des marqueurs microsatellites pour les trois espèces du système d'étude soit *R. imitator*, *R. ventrimaculata*, *R. variabilis*. Ces marqueurs permettront de vérifier si *R. ventrimaculata* et *R. variabilis* sont bien des espèces distinctes et déterminer si les populations de *R. imitator* se sont diversifiées après celles des espèces modèles.

**Question: La structure géographique des signaux aposématiques des différentes espèces de *Ranitomeya* est-elle maintenue par les pressions de prédation?**

Afin de répondre à cette question nous testerons si les prédateurs de localités adjacentes sont en mesure de discriminer entre des signaux aposématiques distincts et si le signal aposématique local est avantage par rapport aux signaux exotiques.

**Question: La variation de pressions de sélection est-elle responsable de la diversification des signaux aposématiques chez *R. imitator*?**

Afin de répondre à cette question nous déterminerons si la grande variabilité phénotypique rencontrée chez *R. imitator* dans la zone de transition est due à un relâchement des pressions de sélection ou si elle est causée par des facteurs purement phylogéographiques et/ou démographiques.

## **Chapitre 2**

### **The development and analysis of twenty-one microsatellite loci for three species of Amazonian poison frogs**

Publié dans Conservation Genetic Resources (2009) 1: 149-151

(Modifié pour les besoins de la présente thèse)

Jason L. Brown, Mathieu Chouteau, Travis Glenn, Kyle Summers

## **Abstract**

We describe polymerase chain reaction (PCR) primers and conditions to amplify one poly A, two trinucleotide and 18 tetranucleotide microsatellite loci isolated from two Peruvian poison frogs (*Ranitomeya imitator* and *R. variabilis*). All the primers developed for *R. variabilis* work on a closely related species, *R. ventrimaculata*. These primers yielded a high number of alleles (mean 14.4) and showed high levels of heterozygosity (mean 0.76 per locus).

## **Keywords**

*Dendrobates*, microsatellites, primers, *Ranitomeya imitator*, *R. variabilis*, *R. ventrimaculata*, trinucleotide, tetranucleotide.



## Microsatellite development

The small semi-arboreal poison frog *Ranitomeya imitator* displays vivid colors and complex dorsal patterns as an aposematic signal (Symula et al. 2001). Surprisingly, the aposematic signal of this frog is highly variable and distinct among different populations, even at the scale of a few kilometres. These variations are believed to be driven by Müllerian mimetism whereby *R. imitator* mimics other *Ranitomeya* species (Symula et al. 2001). The availability of microsatellite markers for these mimetic frogs would enable the characterization of the fine scale population structure, hence clarifying the directionality of the mimetic relationship.

Additionally, the genus *Ranitomeya* exhibit a wide array of parental types from single parental care (i.e. male parental care) to biparental care involving substantial effort from both parents and the provisioning of trophic eggs (Summers & McKeon 2004). The ecological and social factors contributing to the evolution of these parental care types are largely unknown. By characterizing the mating system of the different parental care strategies using microsatellites, we will be better able to understand how complicated parental care behaviors (i.e. biparental care) have evolved and are maintained. Here we present primers that amplify 21 microsatellite loci designed for two species of Peruvian poison frogs: *Ranitomeya imitator* and *R. variabilis*.

DNA was extracted from toe clips using a Qiagen DNeasy tissue kit. Extracted DNA was enriched for (AG)<sub>12</sub>, (TG)<sub>12</sub>, (AAC)<sub>6</sub>, (AAG)<sub>8</sub>, (AAT)<sub>12</sub>, (ACT)<sub>12</sub>, (ATC)<sub>8</sub>, (AAAT)<sub>8</sub>, (AACT)<sub>8</sub>, (AAGT)<sub>8</sub>, (ACAT)<sub>8</sub>, (AGAT)<sub>8</sub> following a modified protocol of Glenn and Schable (2005, 2009). In brief, the DNA was digested with *Rsa*I and *Bst*U I, ligated to SuperSNX linkers, hybridized to biotinylated microsatellite oligonucleotides, captured on Dynabeads and Magnetic Particle Concentrator, unwanted DNA was washed away, captured DNA was recovered by polymerase chain reactions (PCR) using the SuperSNX24 Forward primer (5'GTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATC). To ligate the enriched DNA into a cloning vector we used a TOPO TA Cloning© Kit containing pCR© 2.1-TOPO© with TOP 10 cells and screened for inserts using the *b*-galactosidase gene. Positive colonies were amplified using M13 forward and reverse primers. PCR products of 500–1,000 base pairs (bp) were sequenced using BigDye Terminator v 3.1 ABI (Applied Biological Systems) chemistry and an ABI 377-96 sequencer.

Primers were designed from the flanking sequences of the unique clones to amplify the repetitive elements. PCR conditions were optimized for each primer pair and each locus was evaluated for polymorphism and heterozygosity. Each primer pair was tested on the species they were designed for. *Ranitomeya imitator* and *R. variabilis* were evaluated from three separate populations from North-Central Peru (numbers correspond to the number of each species evaluated at each population, respectively): Cainarachi Valley (45, 61), Chazuta (65, 2), and Pongo de Cainarachi (151, 26). The forward primer of each pair was labeled at its 5' end with one of the four following fluorescent labels for G5 sequencers (VIC, 6-FAM, NED, PET). The conditions for PCR were 10  $\mu$ l 10X Buffer (Invitrogen), 20 mM  $MgCl_2$ , 4 mM dNTP (Promega), 0.05 u of Taq polymerase (Invitrogen), and 10  $\mu$ mol of both primers in a final reaction volume of 20  $\mu$ l. Between 25–75 nanograms of DNA were used as a template. We also performed reactions using a final volume of 10  $\mu$ l (using half the previously mentioned amounts). Two PCR amplification temperature profiles were used: (1) 94°C for 3 min, 32 cycles of 92°C for 30 s,  $T_a$  for 30 s, 72°C for 2 min and a final extension of 72°C for 5 min or, alternatively, (2) 92°C for 10 s, 44 cycles of 92°C for 10 s,  $T_a$  for 30 s, 68°C for 30 s and a final extension of 68°C for 5 min. PCR products were diluted (1:10) and then 1–2  $\mu$ l of each dilution were multiplexed with other loci (up to 4). We added 10  $\mu$ l formamide and 0.1  $\mu$ l size standard (ABI Genescan 600 Liz) to the total volume of multiplexed mixture. Products were resolved on an ABI 3130 Genetic Analyzer capillary DNA sequencer and were scored and binned using ABI Genemapper 4.0 software.

Twenty polymorphic loci were found. The number of alleles ranged from 2 to 30 per locus (mean 15.5). All primers designed for *R. variabilis* function on *R. ventrimaculata* individuals from San Martin, Peru. Observed and expected heterozygosities and estimates of linkage disequilibrium between loci were calculated using GenePop 4.0 (Rousset 2008). Observed heterozygosity ranged from 0.05 to 0.92 (mean = 0.76). Two of the 21 loci, RimiE02 and RvarD01, were determined to be significantly ( $p < 0.05$ ) out of Hardy–Weinberg equilibrium. For both loci this could be due to heterozygote deficiency ( $p < 0.001$ ) and may indicate the presence of null alleles at these loci. We detected evidence of linkage between RvarD01 and RvarD04 ( $p = 0.031$ ) and RimB02 and RimiE03 ( $p = 0.031$ ). No other loci appear to be in linkage disequilibrium. For four *R. imitator* loci (B02, B07, E02, C05), we present two sets of primer pairs that amplify the same locus, but yield

different sized products (Table 2.1). To check our results, we used Micro-Checker v2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004) and found no evidence for scoring errors.

**Table 2.1:** Microsatellite loci for *R. imitator* (Rimi) and *R. variabilis* (Rvar) including: primer sequence, repeat motif, annealing temperature ( $T_a$ ), observed size range of alleles in basepairs (bp), number of alleles, average observed population heterozygosity ( $H_o$ ), average expected population heterozygosity ( $H_e$ ), and GenBank Accession No.

Locus	Primer sequences( 5'-3')	Repeat motif	Ta (°C)	Range of products (bp)	No. of alleles	Ho	He	GenBank Accession No.
<b>RvarA09</b>	CTGCATGAATCAGTTAACTGCC CGGGATTGTGACCGGTGATTTC	AGAT	58	98-186	13	0.77	0.86	GQ273464
<b>RvarB01</b>	ATGGAATATTGAGTGCTGCC AAAAGGGGCCACACTGGATCC	AGAT	52	112-150	10	0.70	0.89	GQ273462
<b>RvarC01</b>	GAAAGAAGTGGGGCTGTCTG TCACCATCAATCCTAGGGAAA	GAT	58	231	1	-	-	GQ273465
<b>RvarD01+</b>	GAAAAAGCATTACAGCTCATCAA GCCGAAACATTGCCATAAA	TCTA	58	180-272	14	0.89	0.76	GQ273466
<b>RvarD04+</b>	TCATCATGAACTGCGAGTGA TGATGGCACATTACACTTG	TCA, TCT	58	183-246	3	0.52	0.69	GQ273463
<b>RvarE04</b>	ACAAATGAGGCCATGTGTCA CAAGCCGTTTTCCATTAGA	Poly A and T rich	58	414-421	2	0.43	0.40	GQ273467
<b>RvarF01</b>	TTTCCGTACCCACTGTATATTATCTC GGTAATTGGCACTGAGAGCTG	TCTA	58	232-281	13	0.84	0.89	GQ273468
<b>RvarF08</b>	CATCATGAAAGCTGACAGATCG GATTGAATAGATAATGGATGGC	TCTA	52	174-374	30	0.92	0.96	GQ273469
<b>RvarG12</b>	CAGTTCACATTGTGATTCAAC	TCTA	52	99-225	22	0.92	0.95	GQ273470

	ATTGTATGGAGATGCTGGAC							
<b>RvarA08</b>	ATTGTTGGGGGATTTTCTATC TGTAAGATATGTAAATTGTGT	TCTA	52	94-118	8	0.70	0.90	GQ273461
<b>RimiA06</b>	CTTAATTGAGTAATTGTCAAG GCTTTTGGATAATCAGTATCG	TCTA	52	98-158	16	0.89	0.90	GQ273471
<b>RimiA07</b>	TTCTTAATTGAGTAATTGTC TCCTTAATATAACCAGTTAAGC	CATA	52	118-178	16	0.86	0.89	GQ273472
<b>RimiB01</b>	TAATTGTATTTGTCACTGAC ATTTTTCGCGGCATATTCGG	TCTA	52	240-288	13	0.73	0.83	GQ273473
<b>RimiB02a*</b>	TCGAGATTTTAGCAGTGTTTATCC CATGAAAACCATATTCGGACA	AGAT	58	116-207	26	0.92	0.94	GQ273474
<b>RimiB02b*</b>	TAGCAGTGTTTATCCACTTAC AAAACCATATTCGGACAATG	AGAT	52	104-204	26	0.92	0.94	GQ273474
<b>RimiB07a</b>	CACCGTGCCTGGTTATCTATC GTTTCGCTCAACCCTAGTGC	TCTA	58	268-316	17	0.83	0.85	GQ273475
<b>RimiB07b</b>	CACCGTGCCTGGTTATCTATC CGTTCCGAGTGTCATGCG	TCTA	58	188-252	17	0.83	0.85	GQ273475
<b>RimiB11</b>	GTAAGTCCGTATATGTCGATG CCTGAGAGTGTAATGGATAGAC	TCTA	52	180-236	15	0.86	0.90	GQ273476
<b>RimiC05a</b>	CGTTTCGCTCAACCCTAGTC ATGGAGGCAATCCACAAATC	TCTA	58	208-331	18	0.70	0.74	GQ273477
<b>RimiC05b</b>	TAGTCATTAGTGTGTGTTTC CTTGCCAGATATGGAGGC	TCTA	52	204-280	18	0.70	0.74	GQ273477
<b>RimiE02a</b>	GCAGAGGGGATTAGGGACTC TGGGTAGCTGTGTTCCATGA	TCTA	58	312-395	23	0.89	0.64	GQ273479
<b>RimiE02b</b>	TGGGAAAACCTGGTCACAAG GAGTTCACATGGGTGGACC	TCTA	52	208-308	23	0.89	0.64	GQ273479
<b>RimiE03*</b>	GTTCAGGCTCAGCAGCTCTT GGTGATGGAGAGGTAATAGATTGG	TCTA	58	416-560	20	0.89	0.88	GQ273480

<b>RimiD04</b>	CTCCAAAACACACCCCAAAC	AGAT	58	210-228	3	0.05	0.05	GQ273478
	AGAGGTGCTGCCCTTTTGTA							
<b>RimiF06</b>	TTGATATTCTGAGGTATG	TCTA	52	172-252	21	0.89	0.91	GQ273481
	GTAGCTTATGGCAGCTACG							

Note: + and \* are loci that are linked. Loci ending in ‘a’ and ‘b’ (i.e. RimiB02a and RimiB02b) are primer pairs that amplify the same locus.

## Acknowledgments

We are grateful to Sue McRae, Dennis Meyer, Bryan Richardson, Carol Goodwillie, and Justin Yeager for assistance in the laboratory or help analyzing products. We are also thankful to Bernard Angers (University of Montreal) for sharing his technical expertise. We are very grateful to C. Aguilar, J. Cordova, and K. Siu Ting for their help at the Museo de Historia Natural, San Marcos, Peru, and Karina Ramirez for help at the Ministry of Natural Resources. This research was funded by grants from the National Science Foundation (IOB-0544010), the National Geographic Society (7658-04), the National Sciences and Engineering Research Council of Canada and an East Carolina University Research and Development Grant (2006). Research permits were obtained from the Ministry of Natural Resources (INRENA) in Lima, Peru (Authorization No. 050-2006-INRENA-IFFS-DCB, No. 067-2007-INRENA-IFFS-DCB, No. 005-2008-INRENA-IFFS-DCB).

## **Chapitre 3**

### **Advergence in Müllerian mimicry: the case of the poison-dart frogs of Northern Peru revisited**

Publié chez Biology Letters (en ligne) doi: 10.1098/rsbl.2011.0039

Mathieu Chouteau, Kyle Summers, Victor Morales, Bernard Angers

## Abstract

Whether the evolution of similar aposematic signals in different unpalatable species (i.e. Müllerian mimicry) is due to phenotypic convergence or advergence continues to puzzle scientists. The poison-dart frog *Ranitomeya imitator* provides a rare example in support for the hypothesis of advergence: this species was believed to mimic numerous distinct model species because of high phenotypic variability and low genetic divergence among populations. In this study, we test the evidence in support of advergence using a population genetic framework in two localities where *R. imitator* is sympatric with different model species, *R. ventrimaculata* and *R. variabilis*. Genetic analyses revealed incomplete sorting of mitochondrial haplotypes between the two model species. These two species are also less genetically differentiated than *R. imitator* populations on the basis of both mitochondrial and nuclear DNA comparisons. The genetic similarity between the model species suggests that they have either diverged more recently than *R. imitator* populations or that they are still connected by gene flow and were misidentified as different species. An analysis of phenotypic variability indicates that the model species are as variable as *R. imitator*. These results do not support the hypothesis of advergence by *R. imitator*. Although we cannot rule out phenotypic advergence in the evolution of Müllerian mimicry, this study reopens the discussion regarding the direction of the evolution of mimicry in the *R. imitator* system.

## Keyword

Phenotypic advergence, *Ranitomeya*, mimicry.

### 3.1 Introduction

The diversification of aposematic signals in Müllerian mimicry is a puzzling phenomenon, because mimicry is expected to promote uniformity in warning signals (Müller 1978). Yet substantial variation in aposematic signals has been shown in, for example, Neotropical butterflies (Brower 1996) and poison-dart frogs (Symula et al. 2001) throughout their range. Such diversification raises the question of whether two sympatric species both change towards a common phenotype (i.e. convergence) or if the phenotype of one species moves toward the phenotype of another species that remains constant (i.e. advergence) as expected in Batesian mimicry (Mallet 2001). Advergence is considered more likely when one species' aposematic signal is established before the arrival of a second species (Mallet & Joron 1999; Symula et al. 2001). Empirical evidence, principally available indirectly for the putative case of the poison-dart frog *Ranitomeya imitator*, has thus far tended to support advergence (Ruxton et al. 2004; Sherratt 2008).

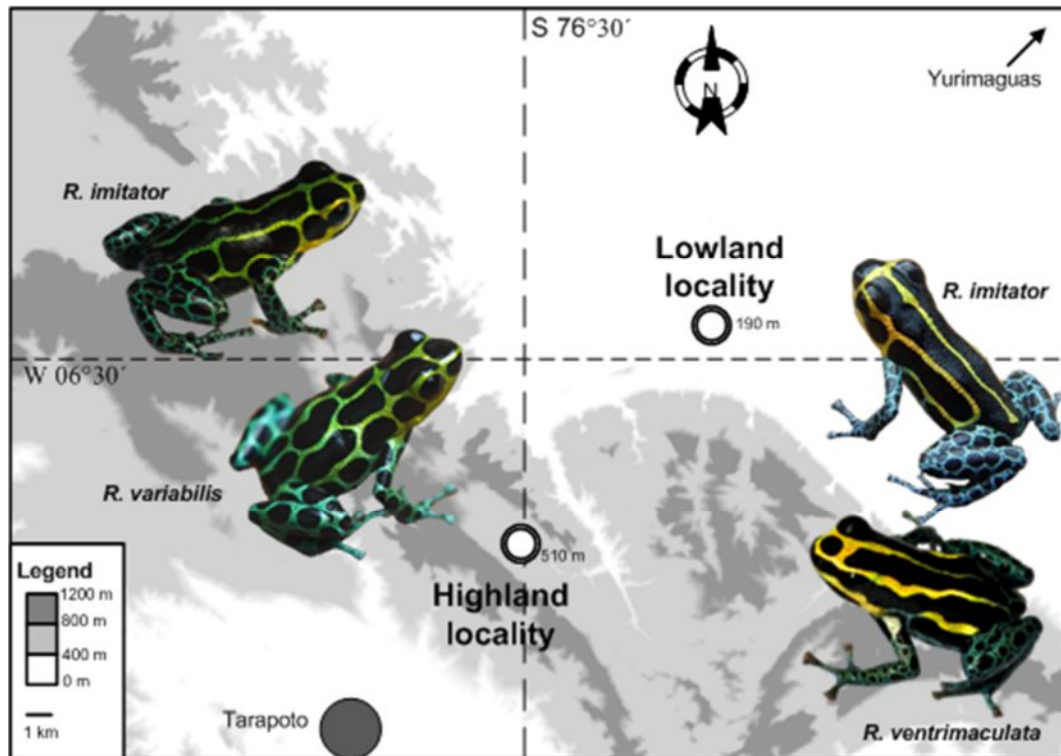
Symula et al. (2001) concluded, using a small number of individuals per population, that the phenotypically variable *R. imitator* mimics distinct model species in different geographical areas. This was supported by the small divergence measured between mitochondrial haplotypes of different *R. imitator* colour morphs compared to that observed between model species, suggesting that *R. imitator* had undergone a relatively recent geographical radiation during which it adopted the aposematic signals of the distinct model species it encountered (Mallet 2001).

However, due to the importance of this textbook example for the field of evolutionary biology of mimicry (Ruxton et al. 2004; Sherratt 2008), we re-addressed the theory of advergence in the *R. imitator* system using population genetics, in the localities originally used for the description of the mimicry association (Symula et al. 2001). We compared two adjacent but phenotypically distinct populations of *R. imitator* and its local sympatric model species, *R. ventrimaculata* and *R. variabilis*. We specifically test the following predictions in support of advergence: 1) The model species display higher genetic differentiation compared to *R. imitator* populations and 2) *R. imitator* is more phenotypically variable within and between regions than the model species (Mallet & Joron 1999).



### 3.2 Materials and methods

The sampling was performed in the department of San Martín (Peru) in two adjacent localities separated by ca. 16 km (Figure 3.1). A minimum of 15 individuals per species were caught in these localities (Table 3.1). Individuals were digitally photographed under standard conditions next to a black-grey-white card for colour standardization, and toe clips were collected for genetic analyses.



**Figure 3.1:** Map of the study area showing the localities under investigation and the phenotypes of the paired *Ranitomeya* species.

The control region was used to assess the genetic diversity of the mitochondrial genome. The primers 5'-AATGTATATGCCATTATC-3' and 5'-GAAATATTATAGACCTATATC-3' designed on *Oophaga pumilio* sequences (Wang & Shaffer 2008) successfully amplified a segment of 274 bp for *R. imitator* and 273 bp for both model species (GenBank accession number: JF340126 - JF340141). Haplotype frequencies were assessed using SSCP and the distinct haplotypes were sequenced. Sequence alignment was performed using CLUSTALW. Genetic differentiation between

populations was evaluated with both haplotype frequency ( $F_{ST}$ ) and sequences ( $\Phi_{ST}$ ) using Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005). Arlequin was also used to infer a haplotype minimum spanning network and to assess the mean number of mutations between populations.

Genetic diversity of the nuclear genome was assessed with nine highly variable microsatellite loci: RimiA06, RimiA07, RimiB01, RimiB02b, RimiB07b, RimiB11, RimiC05b, RimiE02b, RimiF06 for *Ranitomeya imitator* and four loci: RvarA09, RvarB01, RvarF08 and RvarG12 for both *R. variabilis* and *R. ventrimaculata* according to Brown et al. (2009). Exact tests for Hardy-Weinberg equilibrium, differentiation in allele frequencies and estimation of  $F_{ST}$  and  $R_{ST}$  were computed using Arlequin 3.1. The relevance of these metrics (nDNA  $F_{ST}$  vs  $R_{ST}$  and mtDNA  $F_{ST}$  vs  $\Phi_{ST}$ ) was tested using SPAGeDI (Hardy & Vekemans 2002). STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al. 2000) was used without prior population information to confirm population organisation. Runs were performed with a burn-in length and MCMC of 100,000 generations and 10 runs were performed for  $K = 2$  to 5. The best number of clusters  $K$  was *a posteriori* determined according to Evano et al. (2005).

The individual photographs were corrected for ambient light colour and the dominant hue of the HSB colour domain was used to quantify the conspicuous dorsal colouration of individuals (Robertson & Robertson 2008). Each individual was then assigned to one of the three following qualitative bins based on their hue: light orange ( $30^\circ$ - $60^\circ$ ), yellow ( $61^\circ$ - $90^\circ$ ) and green ( $91^\circ$ - $120^\circ$ ). The dorsal pattern in the localities studied consisted of 3 well separated longitudinal stripes with different degrees of reticulation between them. Each individual was assigned to a qualitative bin based on the amount of reticulation: no reticulation (0), slightly reticulated (1-2), reticulated (3-4) and highly reticulated (5+). Comparison of variance between sites was assessed using Levene's test (W).

### 3.3 Results

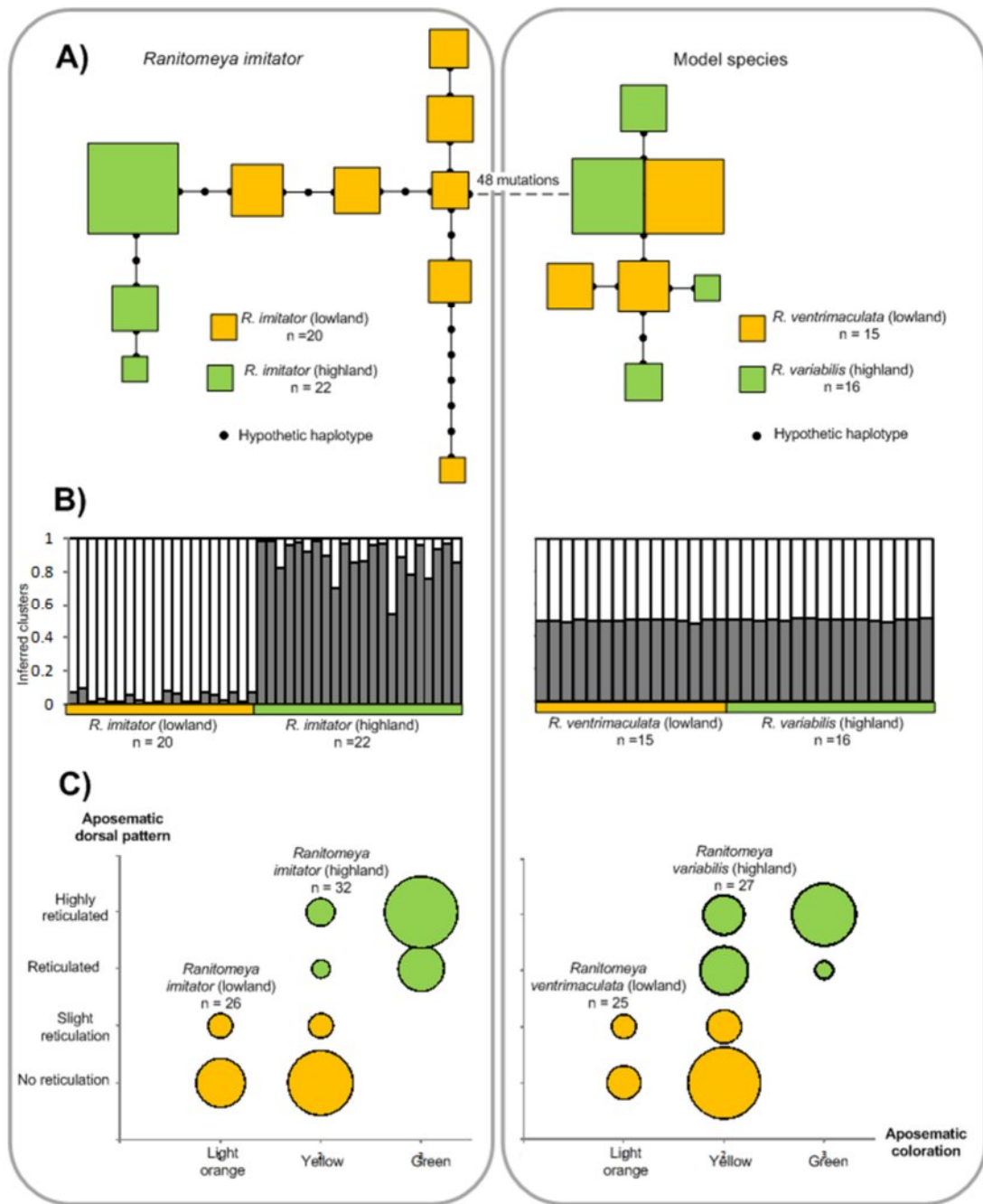
Both the mitochondrial and nuclear markers displayed high diversity within population (Table 3.1). The mitochondrial minimum spanning network (Figure 3.2A)

revealed that populations of *R. imitator* are characterised by distinct haplotypes, with a mean number of 1.84 mutations between populations. On the other hand, the haplotypes of *R. ventrimaculata/variabilis* are intermingled and both species had one common haplotype in high frequency, resulting in a number of mutations (0.14) one order of magnitude lower than for *R. imitator*. All populations were in Hardy-Weinberg equilibrium for nuclear markers and exact tests of differentiation are significant ( $p < 0.001$ ). The estimates of differentiation assessed with mtDNA and nDNA (Table 3.1) are higher between populations of *R. imitator* than between the model species, even when the four loci displaying the lowest differentiation are used to compensate for the different number of loci available between species. SPAGeDI results confirm that the use of the mutational information ( $F_{ST}$  vs  $R_{ST}$ ) is relevant for *R. imitator* but not between model species (Table 3.1). This is concordant with the STRUCTURE results, where *R. imitator* individuals are clearly separated into two populations according to their geographic location, while individuals of *R. ventrimaculata/variabilis* failed to be properly assigned to their species of origin for all K-values tested (Figure 3.2B).

The comparison of phenotypic variability between *R. ventrimaculata* and *R. imitator* living in the lowland localities ( $W_{1,6} = 0.194$ ,  $p = 0.675$ ) and between *R. variabilis* and *R. imitator* in the highland ( $W_{1,6} = 0.286$ ,  $p = 0.612$ ) show that both species display similar levels of variation and that they share the same aposematic signal in each locality (Figure 3.2C). When the results for both localities are pooled, *R. imitator* and *R. ventrimaculata/variabilis* exhibit the same level of phenotypic variability ( $W_{1,14} = 0.007$ ,  $p = 0.936$ ).

**Table 3.1:** Genetic variability and differentiation estimated from nuclear and mitochondrial markers between populations of *Ranitomeya imitator* and the model species. The associated probabilities after 999 random permutations are indicated in parenthesis. Test for relevance of molecular information is included for both the nuclear loci and mitochondrial control region.\* Differentiation measured using the four loci displaying the lowest differentiation.

	<i>R. imitator</i>		Model species	
	Lowland	Highland	<i>R. ventrimaculata</i> (lowland)	<i>R. variabilis</i> (highland)
	n = 20	n = 22	n = 15	n = 16
Nuclear				
Mean number of alleles per loci (Mean ± s.d)	11.2 ± 2.1	11 ± 3.4	12.5 ± 3.3	11 ± 2.83
H <sub>E</sub> (Mean ± s.d)	0.863 ± 0.065	0.861 ± 0.038	0.879 ± 0.044	0.803 ± 0.123
F <sub>ST</sub> (95% C.I.)	0.103 (0.092-0.118) (p < 0.001)		0.023 (0.000 - 0.041) (p = 0.034)	
	0.074 (0.051-0.098) (p < 0.001)*		.	
R <sub>ST</sub> (95% C.I.)	0.206 (0.123-0.266) (p < 0.001)		0.039 (0.000-0.072) (p = 0.200)	
	0.128 (0.098-0.157) (p < 0.001)*		.	
Probability that R <sub>ST</sub> > F <sub>ST</sub>	p = 0.002		p = 0.523	
Mitochondrial				
Number of haplotypes	7	3	3	4
H <sub>D</sub> (Mean ± s.d)	0.901 ± 0.076	0.432 ± 0.132	0.670 ± 0.081	0.591 ± 0.121
F <sub>ST</sub>	0.343 (p < 0.001)		0.083 (p = 0.069)	
Φ <sub>ST</sub>	0.596 (p < 0.001)		0.115 (p = 0.019)	
Probability that Φ <sub>ST</sub> > F <sub>ST</sub>	p = 0.042		p = 0.438	



**Figure 3.2:** Genetic and phenotypic differences between the *Ranitomeya imitator* populations and between model species. A) Minimum spanning network inferred from the mitochondrial DNA haplotypes. Each box represents a distinct haplotype and its size refers to the relative abundance within populations. B) Individual assignment among K = 2 clusters (black and white) using STRUCTURE and, C) Frequency distribution of the different aposematic phenotypes (as colours and dorsal patterns) found within the different populations. The size of the circles represents the relative abundance of the phenotypes.

### 3.4 Discussion

The predictions of the advergence hypothesis in *R. imitator*, regarding genetic differentiation and phenotypic variability (Mallet & Joron 1999; Symula et al. 2001), are not supported by the results of the present study.

Results of this study revealed that, in spite of a clearly distinct aposematic signal (Zimmerman & Zimmerman 1988), *R. ventrimaculata* and *R. variabilis* display very low genetic differentiation. Incomplete sorting of mtDNA haplotypes,  $F_{ST}$  values not significantly different from zero and the inability to assign individuals to its species of origin (STRUCTURE) clearly indicate a recent separation of these groups. While it is not possible in the absence of data on reproductive isolation to determine whether *R. ventrimaculata* and *R. variabilis* are populations of the same species or distinct species, we can conclude that these two groups were recently connected by a common ancestor in both of these scenarios. This is consistent with previous phylogenetic analyses which show that *R. ventrimaculata* is a polyphyletic taxa characterized by the *R. variabilis* and *R. ventrimaculata* from our studied localities being closely related but clearly different from other *R. ventrimaculata* (Symula et al. 2003).

These findings are important because the identification of the mimicking species is in part based on phenotypic variability; i.e. the mimicking species is expected to be more phenotypically variable across localities than its model species (Mallet & Joron 1999). Since *R. ventrimaculata* and *R. variabilis* belong to the same lineage and have most likely diverged recently, they are in fact as variable as *R. imitator* in the present system.

Another striking result is that the populations of *R. imitator* are far more genetically differentiated than those of *R. ventrimaculata/variabilis* for both genomes. This result is inconsistent with the results of Symula et al. (2001), whose objective was to assess the Müllerian mimicry relationship but not its direction. The difference is most likely the result of the small number of individuals analysed by Symula et al. (2001), which prevented them from accurately assessing the levels of differentiation between these genetically diverse species. This casts doubt on the hypothesis that populations of *R. imitator* diversified after the model species and adopted their aposematic signal (Symula et al. 2001). To assess the directionality in mimicry, the chronology of founding events in a given locality is essential.

However, it is also important to note that genetic differentiation may represent an inappropriate measure of this chronology in the absence of complete phylogeographic information.

Symula et al. (2001) also discussed a third species, *Ranitomeya summersi* (previously called *R. fantastica*), which is mimicked by another colour morph of *R. imitator*. Because this clade is genetically very distinct from both *R. imitator* and *R. ventrimaculata/variabilis*, it could be argued that genetic differences between the model species remain higher than among the *R. imitator* colour morphs. However, numerous other colour variants in the *R. fantasticus* clade have been discovered since the initial description of the system, some of which are sympatric and involved in mimicry with both *R. imitator* and *R. ventrimaculata/variabilis* (Brown et al. 2008). Because all species involved in this Müllerian mimicry show high phenotypic variability, conclusions from phenotypic variability or genetic distances between clades remain inconclusive in this system.

In conclusion, our results cast doubt on the evidence previously used to infer the hypothesis of mimetic advergence in the *Ranitomeya* species, as our results contradict two key predictions used in the initial description of the system. This study is of particular importance because the *R. imitator* system is commonly considered to provide the strongest empirical evidence for advergence (Ruxton et al. 2004; Sherratt 2008). This does not mean that the theory of advergence is false or that *R. imitator* is not the mimic, but rather that no empirical evidence exists as of yet. This study reopens the discussion concerning the direction of mimicry in the *Ranitomeya imitator* system.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Melanie McClure, Méloé Prud'Homme, Christelle Leung and Jason Brown for their valuable help. This research was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council scholarship of Canada to Mathieu Chouteau. Collecting and export permits for Peru were provided by the Instituto Nacional de Recursos Naturales: permits n° 005-2008-INRENA-IFFS-DCB and CITES n° 11067.

## **Chapitre 4**

### **The role of predators in maintaining the geographic organization of aposematic signals**

Sous-presse dans The American Naturalist

Mathieu Chouteau, Bernard Angers



## Abstract

Selective predation of aposematic signals is expected to promote phenotypic uniformity. But while uniform within a population, numerous species display impressive variations in warning signals among adjacent populations. Predators from different localities learning to avoid distinct signals while performing intense selection on others are thus expected to maintain such a geographic organization. We tested this assumption by placing clay frog models, representing distinct color morphs of the Peruvian poison-dart frog *Ranitomeya imitator* and a non conspicuous frog, reciprocally between adjacent localities. In each locality, avian predators were able to discriminate between warning signals; the adjacent exotic morph suffered up to four times more attacks than the local one and two times more than the non conspicuous phenotype. Moreover, predation attempts on the exotic morph quickly decreased to almost nil, suggesting rapid learning. This experiment offers direct evidence for the existence of different predator communities performing localized homogenizing selection on distinct aposematic signals.

## Keyword

Aposematism, predation, polymorphism, poison-dart frog, spatial structure

## 4.1 Introduction

Aposematism occurs when prey advertise their unpalatability to predators by displaying conspicuous colors and patterns (i.e. warning signals; Ruxton et al. 2004). This evolutionary strategy has been documented in a variety of animal taxa, including gastropods, millipedes, insects, amphibians, fishes, snakes and birds (Ruxton et al. 2004).

Theory predicts that the effectiveness of a warning signal is dependent on the ability of predators to associate the prey's conspicuousness with its unprofitability (Mappes et al. 2005). Hence, by providing predators with an indicator that defenses are present, the education of potential predators in recognizing and avoiding the warning signal is facilitated (Ruxton et al. 2004; Mappes et al. 2005).

While in most cases predators learn to avoid the most abundant warning signal, rare and novel phenotypes are not recognized as unpalatable and are therefore quickly counter-selected, thereby maintaining the uniformity of the warning signals (Benson 1972; Mallet & Barton 1989; Kapan 2001; Pinheiro 2003). Although many organisms display monomorphic warning signals locally, impressive geographic variations of aposematic signals have been documented, sometimes at a scale of only a few kilometers. For instance, the Neotropical butterflies *Heliconius melpomene* and *Heliconius erato*, which are Müllerian mimics, exhibit up to 30 different combinations of color and pattern throughout their range (Jiggins & McMillan 1997). Similar mosaics have also been documented in other mimetic communities such as millipedes (Marek & Bond 2009), burneth moth (Turner 1971), cotton stainer bugs (Zrzavy & Nedved 1999), net-winged beetles (Bocak & Yagi 2009) and frogs (Symula et al. 2001) as well as in non mimetic species (Noonan & Gaucher 2006; Wang & Shaffer 2008).

Although the mechanisms remain uncertain, theoretical models (Joron & Iwasa 2005; Sherratt 2006) suggest that localized positive frequency-dependent predation, if strong enough, could explain the maintenance of geographic mosaics characterized by the aposematic signals being locally monomorphic, but displaying differences between localities. Such selection would lead to situations where predators from different localities recognize and avoid distinct warning signals. Previous studies, principally performed within a single aposematic signal's distribution or under laboratory conditions, have

reported a higher predation rate of the exotic or novel warning signals compared to that of the local warning display, suggesting that predators have the ability to discriminate between distinct warning signals (Benson 1972; Mallet & Barton 1989; Kapan 2001; Pinheiro 2003; Harper & Pfennig 2007; Noonan & Comeault 2009; Borer et al. 2010; Kikuchi & Pfennig 2010).

A few studies have also investigated the differences in the discriminative behavior of predators from different localities. For instance, it has been shown in *Heliconius* butterflies (Mallet & Barton 1989) and alpine leaf beetles (Borer et al. 2010) that, when reciprocally transplanted in an adjacent locality dominated by another aposematic signal, the exotic signal suffers more predation attempts than the local aposematic signal. However, even if more frequently attacked, it is not known if the exotic aposematic signal loses or retains its aposematic advantage over non-conspicuous sympatric taxa. Including a non-conspicuous signal in these studies would provide a means to weigh the selection pressure and help explain why uniformity of warning signals is observed instead of a non-equilibrium polymorphism. Despite having only been tested in a single locality, Noonan and Comeault (2009) did present empirical evidence that an exotic aposematic signal originating from a remote and isolated locality loses its aposematic advantage. However, little is known about the strength of the discriminative behavior of predators between adjacent localities, where predators may encounter the exotic aposematic signals more often due to the possible passage of both the predator and the prey between localities.

Interestingly, some of these experiments have demonstrated that the predation of the novel aposematic morphs mostly occurred shortly after they were released into the habitat, thus suggesting rapid avoidance learning by predators (Mallet & Barton 1989; Kapan 2001). Laboratory experiments have confirmed the capacity of predators (i.e. birds) to learn to recognize and subsequently avoid novel aposematic signals on which they were trained (Alatalo & Mappes 1996; Mappes & Alatalo 1997; Riipi et al. 2001; Pinheiro 2003; Rowland et al. 2007). However, whether the spatial structure of aposematic signals is the result of the differential learning experiences of the natural predator communities has not yet been confirmed.

This study focuses on the ability of predators from adjacent localities to discriminate between distinct warning signals. To ascertain the discriminative behavior of

the predator, predation on artificial prey models corresponding to either the local or the exotic aposematic signal will be compared within and between two sites harboring different aposematic signals. In contrast to previous studies, we will use non-conspicuous models to weigh selection on both aposematic phenotypes (in order to determine whether they retain their aposematic advantage when transplanted). The learning capacity of predators will be ascertained according to changes in the predation rate over time.

At the edge of the Andes and the Amazonian lowlands in Northern Peru resides the small poison-dart frog *Ranitomeya imitator*. This frog, while monomorphic within a given locality, displays highly variable and distinct aposematic signals among different localities. In the higher elevations of the Cainarachi Valley, *R. imitator* possesses a green reticulated pattern on a black background on the head, dorsum and flanks, and the legs and ventral area have smaller blue-green reticulations on a black background. Ten kilometers to the East, in the lowland near the city of Yurimaguas, *R. imitator* displays a head, dorsal and flank pattern consisting of thin longitudinal yellow stripes on a black background, while the legs and ventral area have a blue-green reticulation on a black background. Such systems, possessing adjacent phenotypically fixed aposematic signals, appear ideal for ascertaining the role of predators in the maintenance of geographically structured aposematic signals.

## 4.2 Materials and methods

The field experiments were conducted in the Department of San Martin (Peru) just before the start of the rainy season (December 2009). Two sites separated by approximately 15 km were chosen for this study. In the first site, a valley of high elevation (S 06°25'17.0'' W 076°17'28.4'' alt. 514 m), *R. imitator* displays a vivid green reticulated dorsal pattern on a black background. The second site is situated in the lowland (S 06°17'23.0'' W 076°13'43.9'' alt. 192 m) and *R. imitator* displays a dorsal gold striped pattern on a black background.

To test whether the observed geographic structure in aposematic signals is the result of the discriminative behavior of predators and if this behavior is the result of the natural

predators' ability to learn to recognize aposematic signals, clay frog models were placed in the habitat (Saporito et al. 2007; Noonan & Comeault 2009).

The models, measuring 18mm in length (i.e. snout-vent length) were made of colored Funstuff® Plastimodál modelling clay molded with a plaster mold and portions of toothpicks were used to make the front legs in order for the models to have a more natural posture. These models were hand-painted with Delta Ceramcoat® Acrylic Paint to mimic the two distinct combinations of colors and patterns found among the two mimetic populations of *R. imitator*. A model of a non aposematic brown frog similar to the day-time coloration of some species of frogs in the genus *Eleutherodactylus* was used as a control to weigh selection (Figure 4.1). In both sites, three hundred models of each color and pattern combination (i.e. 900 models) were randomly placed along trails, with a minimum distance of 5 m between models. To mimic the habitat use of *R. imitator*, the models were positioned on living understory leaves ranging from 0.5 to 2 m in elevation and were secured using a toothpick so they would not fall in the event of wind, rain or predation attempts. The models were checked for predation attempts at 24 h intervals during the 72 h for which they were left at the sites. In order to standardize, between days, the disturbance to predators caused by our visits to the sites, each daily visit occurred at the same time that we had initially placed the models (11 am) and we always followed the same route, taking approximately the same amount of time to do so everyday (i.e. approximately 6 h). At each visit, attacked and destroyed models were removed and missing models of each phenotype were counted.



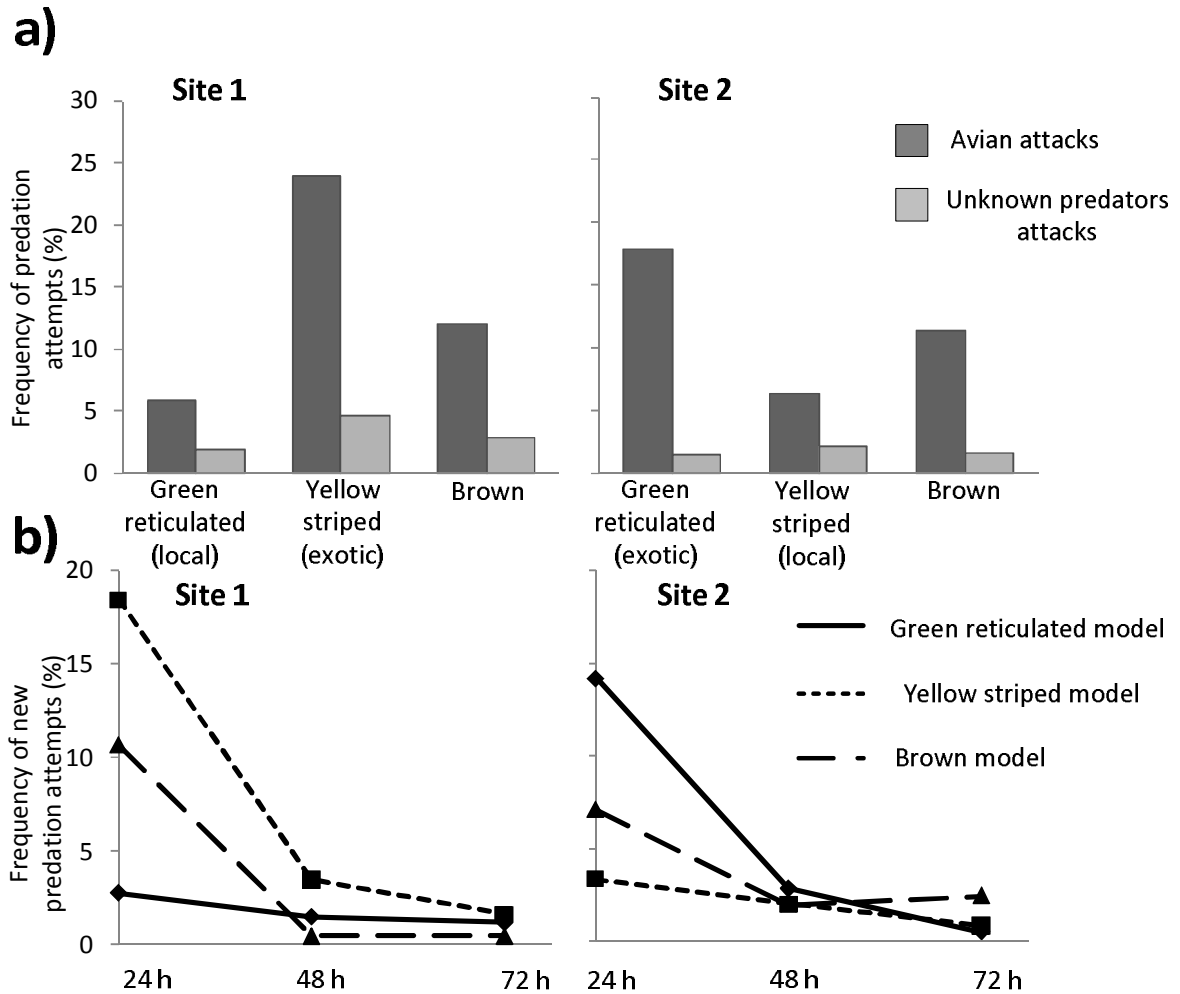
**Figure 4.1:** The two aposematic phenotypes of *Ranitomeya imitator* (upper row) and their respective clay models below (lower row, left and right), as well as a non conspicuous frog model (lower row, middle) used to measure predation rates.

Predation marks on malleable models were analyzed in respect to the color and pattern combination and the nature of the predators (Brodie III 1993; Kuchta 2005; Saporito et al. 2007; Noonan & Comeault 2009). For each site, variation in predation pressure between the different phenotypic models was compared globally and after each of the 24 h observation, using a global Chi-square test of independence on global or novel attack frequencies. When significant, the Freeman-Tukey deviates (FT) was compared to a  $\alpha = 0.05$  criterion, corrected for multiple comparisons using the Bonferroni method, in order to identify which model phenotype suffered significantly more or fewer predation attempts than expected under the null hypothesis of equal attack probabilities. The same statistical approach was used to ascertain the learning capacity of predators; variation in the frequency of new attacks for each of the three daily intervals and for a given model phenotype was analyzed using a global Chi-square test of independence followed by a Bonferroni corrected Freeman-Tukey deviates test.

### 4.3 Results

Of the 900 models placed in each site, 94 models (10.4 %) in site 1 and 126 in site 2 (14.0 %) were missing or had been partly destroyed by ants or roaches and were excluded from the analyses. Ant bite marks are characterized by 2 symmetrical incisions and greatly vary in size and number on an individual model, while roach bite marks, although tiny, usually completely destroy a model due to their large numbers (the resulting model has a porous appearance). Of the remaining clay replicas, 127 models (15.8 %) in site 1 and 102 models (13.2 %) in site 2, displayed marks of attacks by predators. Attacks by avian predators were recognizable by the pair of U shaped marks left on opposite sides of the models (e.g., Brodie III 1993) or by stab marks on the dorsum of the model (e.g., Kutcha 2005). Because of the small size of these models, many models bearing marks of bird attacks were torn in half. Other forms of attack included variably deep puncture marks or missing body parts without any recognizable marks on the remaining body and were categorized as unknown predator attacks.

In both sites, attack rates of avian predators for the different phenotypic clay models was significantly different ( $\chi^2_2 \geq 15.662$ ;  $p \leq 0.001$ ; Figure 4.2a). However, the attacks made by unknown predators did not appear to significantly differ between model phenotypes ( $\chi^2_2 \leq 2.411$ ;  $p \geq 0.299$ ; Figure 4.2a), although this might be a result of low statistical power due to the low number of unknown predators attacks observed.



**Figure 4.2:** Predation frequency on clay models representing a non conspicuous phenotype (brown) and two aposematic phenotypes of *Ranitomeya imitator* (green reticulated and yellow striped) in two sites characterized by distinct aposematic signals. a) Frequency of predation attempts by avian (dark grey) and unknown predators (light grey) on the different models. b) Frequency of avian predation attempts as a function of time for each clay model phenotypes.

Avian predation pressure appears geographically structured, as in both sites the distinct local aposematic signal ( $FT \leq -2,791$ ;  $p < 0.05$ ; Figure 4.2a) suffered nearly four times fewer predation attempts than the geographically adjacent and exotic warning signal ( $FT \geq 2.496$ ;  $p < 0.05$ ; Figure 4.2a). The observed frequency of attacks on the brown model is intermediate between the local and the exotic aposematic signal and does not deviate from expected values ( $FT_{glob} = -0.363$  in site 1;  $FT_{glob} = -0.155$  in site 2;  $p > 0.05$  in both



site; Figure 4.2a). As such, in the first site (Figure 4.2a), the frequency of avian predation attempts was highest on the yellow striped (i.e. exotic) models (26.6%), followed by the brown models (14.2 %), and the green reticulated phenotype (i.e. local) was the less frequently attacked (7.2 %). In the second site (Figure 4.2a), the green reticulated models (i.e. exotic) were the most frequently attacked (18.9 %), followed by the brown (12.7 %) and the yellow striped (i.e. local) models (8.2 %).

The changes in attack frequency on the different models over time are illustrated in figure 4.2b. In both sites the attack rate on the local aposematic signal was low and did not significantly change during the 72h trial ( $\chi^2_2 \leq 3.828$ ;  $p \geq 0.148$ ). However, for both the exotic aposematic signal and the brown model, attack frequency significantly varied ( $\chi^2_2 \geq 11.493$ ;  $p \leq 0.003$ ); in both sites, the majority of attacks occurred during the first 24 h of the trial ( $FT \geq 2.302$ ;  $p < 0.05$  in both site) and quickly decreased before stabilizing between 24 h and 72 h (Figure 4.2b; Table 4.1). As such, while the difference in predation rates between the three types of clay models is highly significant after 24 h ( $\chi^2_2 \geq 21.261$ ;  $p < 0.001$ ), it decreases to a similar level after 72 h ( $\chi^2_2 \leq 3.742$ ;  $p > 0.154$ ; Table 4.2).

**Table 4.1:** Test of Freeman-Tukey deviates in individual cells of contingency tables with the number of attacks over time for each model phenotype and for each site. Absolute values larger than the criterion with Bonferroni correction for 6 simultaneous tests (1.52) are in bold. These values identify the cells for which the number of observations significantly ( $p < 0.05$ ) differs (either higher or lower as shown by the sign) from the corresponding expected frequencies. \* indicates contingency tables for which the overall null hypothesis of complete independence of observations was not rejected.

Green reticulated model				
	Site 1		Site 2	
	Attacked	Unattacked	Attacked	Unattacked
24h	*	*	<b>3.92</b>	-1.28
48h	*	*	<b>-2.39</b>	0.56
72h	*	*	<b>-4.82</b>	0.87

Yellow striped model				
	Site 1		Site 2	
	Attacked	Unattacked	Attacked	Unattacked
24h	<b>4.24</b>	<b>-1.635</b>	*	*
48h	<b>-3.08</b>	0.82	*	*
72h	<b>-4.52</b>	1.05	*	*

Brown model				
	Site 1		Site 2	
	Attacked	Unattacked	Attacked	Unattacked
24h	<b>4.12</b>	-1.11	<b>2.30</b>	-0.52
48h	<b>-4.06</b>	-0.61	<b>-1.74</b>	0.34
72h	<b>-3.99</b>	-0.60	-1.23	0.26

**Table 4.2:** Test of Freeman-Tukey deviates in individual cells of contingency tables with the number of attacks for each model phenotype for every 24h observation and for all sites. Absolute values larger than the criterion with Bonferroni correction for 6 simultaneous tests (1.52) are in bold. These values identify the cells in which the number of observations significantly ( $p < 0.05$ ) differs (higher or lower as shown by the sign) from the corresponding expected frequencies. \* indicates contingency tables for which the overall null hypothesis of complete independence of observations was not rejected.

After 24h				
	Site 1		Site 2	
	Attacked	Unattacked	Attacked	Unattacked
Green reticulated	<b>-5.19</b>	1.35	<b>2.97</b>	-1.02
Yellow striped	<b>3.52</b>	-1.39	<b>-3.21</b>	0.81
Brown	0.23	-0.04	-0.55	0.19

After 48h				
	Site 1		Site 2	
	Attacked	Unattacked	Attacked	Unattacked
Green reticulated	-0.14	0.05	*	*
Yellow striped	<b>1.67</b>	-0.24	*	*
Brown	<b>-1.75</b>	0.21	*	*

After 72h				
	Site 1		Site 2	
	Attacked	Unattacked	Attacked	Unattacked
Green reticulated	*	*	*	*
Yellow striped	*	*	*	*
Brown	*	*	*	*

## 4.4 Discussion

Our results demonstrate the ability of adjacent but distinct predator communities to discriminate between different conspicuous signals. The clay models displaying the local combination of color and pattern suffered fewer predation attempts in each habitat. Since the local aposematic signal present in the first site is exotic in the second site and vice versa, our results both validate that the strong homogenizing selection performed by predators can be geographically localized, and emphasize the selective advantage of carrying the right conspicuous signal.

Clay models with the exotic aposematic phenotype, on the other hand, suffered more attacks than those displaying the brown phenotype and up to four times more attacks than those harboring the local warning signal. These differences in predation rates are most likely explained by the geographically adjacent exotic combination of vivid colors and patterns being easily detected by predators, but not initially recognized as being aposematic. As such, these unrecognized phenotypes are at a great selective disadvantage as they lack the protection conferred by crypsis (Mallet & Singer 1987; Mallet & Joron 1999), and due to their conspicuousness, are more easily detected by naïve predators. A similar selection against exotic warning coloration has been demonstrated in *Heliconius* butterflies (Benson 1971; Mallet & Barton 1989; Mallet et al. 1990; Kapan 2001).

Avian predators have been shown to possess the relevant memory pattern to perform such a strong and directed selection (Langham 2004; Ihalainen et al. 2008). Indeed, marks left on clay models indicate that selection pressure on the aposematic signals was mostly performed by avian predators which are known to be common predators of frogs in the tropics (Stiles & Skutch 1989; Poulin et al. 2001; Saporito et al. 2007; Noonan & Comeault 2008). Moreover, a difference in the predation rate according to phenotype was only apparent on models attacked by birds. Birds, which are known for their ability to differentiate colors (Poulin et al. 2001), appear to be the main predators performing selection on visual aposematic signals. This confirms that the inferior number of attacks on the local conspicuous signal is the result of avoidance (Saporito et al. 2007; Noonan & Comeault 2009).

Unknown assailants accounted for the rest of the attacks on the models. While it is possible that some of these attacks were caused by birds, we also documented puncture marks likely left by snakes or spiders (Saporito et al. 2007). In other similar studies, attacks by rodents (i.e. incisor bite marks) usually accounted for a significant proportion of the marks left on the models (Bodie III 1993; Kuchta 2005; Saporito et al. 2007; Noonan & Comeault 2009). The absence of rodent attacks in the present study, which usually leave easily recognizable marks, is most likely the result of placing the clay models on understory leaves, making them less accessible to roaming terrestrial rodents and more easily detected by avian predators.

While the clay models used in our experiments lacked the toxicity and natural behavior of live *R. imitator*, the changes in predation rate over time appear consistent with the expectations that the discriminative behavior of predators is the result of learned avoidance. In both sites the majority of attacks recorded on the non-profitable models harboring the exotic aposematic signal occurred during the first 24h and quickly decreased to nearly nil after 48 to 72 h. Similar observations have been reported for live aposematic *Heliconius* butterflies, whereby predators were less likely to attack individuals after having sampled a few unpalatable prey of the same phenotype (Langham 2004; Rowland et al. 2007; Mallet 2010). A similar trend was found with the brown models being attacked significantly more often during the first 24 h of this experiment. Although these models were built to resemble non-toxic frogs normally well camouflaged in leaf litter or on tree bark, they did not benefit from their usual cryptic appearance since they were placed on green understory leaves and this explains the high number of attacks observed. The decrease in attack rate is consistent with the avian predators having the ability to learn to recognize, and subsequently avoid, novel non profitable prey items, as is expected for aposematism (Ruxton et al. 2004; Sherratt 2008).

It is interesting to note that the rate of attack on the local aposematic signal, while low, did not significantly change over time and is consistent with the expectation that the predator community has already learned to recognize that signal (Pinheiro 2003; Langham 2004; Ihalainen et al. 2008). However, despite being low, models with the local aposematic signal did suffer predation attempts. In the absence of innate avoidance, many hypotheses have been suggested to explain this incomplete avoidance, such as predator error (Lynn

2005), the presence of naïve predators (Saporito et al. 2007), forgetting (Speed 2000), ongoing learning (Noonan & Comeault 2009) or continued testing (Beatty et al. 2004; Noonan & Comeault 2009).

Regardless of an apparent rapid learning, selection on unrecognized (i.e. exotic or novel) signals by predators can be intense. Mathematical models and empirical data have shown that predators sample a fixed number of unpalatable prey independently of their density before learning to reject them (Müller 1878; Ruxton et al. 2004; Sherratt 2006; Rowland et al. 2007; Mallet 2010). Consequently, the more abundant a signal, the lower the per capita mortality will be; hence the rare aposematic signals will experience greater mortality (Greenwood et al. 1989; Kapan 2001; Lindstrom et al. 2001b; Ihalainen et al. 2008). As such, if individuals with novel aposematic signals appear in small numbers in a population, either due to migration or to mutations, the rapid selection performed by predators will most likely prevent the spread of the exotic alleles underlying these phenotypic novelties within the population. Under this scenario, phenotypically distinct populations experiencing purifying selection pressures are expected to be highly isolated from each other. These conclusions are in accordance with research on mimetic *Heliconius* butterflies which demonstrates that selection across populations in the context of aposematism and Müllerian mimicry can promote population divergence and even speciation (Jiggins et al. 2001).

*Ranitomeya imitator* is known to be involved in Müllerian mimicry with up to four species of *Ranitomeya* and displays a similar level of phenotypic variability among populations. While the directionality of the mimetic relationship is unknown (Chouteau et al. 2011), the intense selection performed by predators appears to explain the homogenization of warning signals at a local scale, as well as the maintenance of the geographic organization of aposematic signals between localities. Such selection contradicts early views on mimicry suggesting that convergence of conspicuous coloration is an adaptation to the non-biotic environment (Grobman 1978).

In conclusion, we have empirically confirmed that avian predators can recognize and avoid distinct aposematic signals in different sites while performing intense selection on the novel phenotypes, and this as a possible result of learning experience. This selective predation between close geographical populations is consistent with theoretical models

explaining the maintenance of a geographic organization of aposematic signals, as any migrant or offspring deviating from the predators' recognized warning signal will most certainly suffer an increased risk of mortality.

## **Acknowledgments**

We thank M. McClure, D. Cossios, V. Morales, K. Summers, J. Brown and J. Yeager whose help have made this project possible. We would also like to thank P. Legendre for his help with statistics. This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council scholarship (NSERC) and the Group of Interuniversity Research in Limnology and Aquatic Environment (GRIL) to MC. Research permits for Peru were provided by the Instituto Nacional de Recursos Naturales: permits n° 0122-2010-AG-DGFFS-DGEFFS.

## **Chapitre 5**

### **Wright's shifting balance theory and the diversification of aposematic signals**

Soumis dans PLoS ONE

(Format propre à la revue)

Mathieu Chouteau, Bernard Angers



## Abstract

Despite accumulating evidence for selection within natural systems, the importance of random genetic drift opposing Wright's and Fisher's views of evolution continue to be a subject of controversy. The geographical diversification of aposematic signals appears to be a suitable system to assess the factors involved in the process of adaptation since both theories were independently proposed to explain this phenomenon.

In the present study, the effects of drift and selection were assessed from population genetics and predation experiments on poison-dart frogs, *Ranitomaya imitator*, of Northern Peru. We specifically focus on the transient zone between two distinct aposematic signals. In contrast to regions where high predation maintains a monomorphic aposematic signal, the transient zones are characterized by lowered selection. As a result, the diversification of phenotypes via genetic drift may occur without a significant loss of fitness. These new phenotypes may then colonize alternative habitats if successfully recognized and avoided by predators.

This study highlights the interplay between drift and selection as determinant processes in the adaptive diversification of aposematic signals. Results are consistent with the expectations of the Wright's shifting balance theory and represent, to our knowledge, the first empirical demonstration of this highly contested theory in a natural system.

## Keyword

Diversification, shifting balance, aposematism, selection, *Ranitomeya*

## 5.1 Introduction

Understanding how populations adapt to different selective environments is a central theme in evolutionary biology. Fisher's large population size theory (LST; Fisher 1930) and Wright's shifting balance theory (SBT; Wright 1932;1978) of evolution were developed to explain the process of adaptation. In both theories, natural selection is the only evolutionary force capable of producing adaptation. However, they differ in the role accorded to neutral evolutionary processes (Coyne et al. 1997; Wade & Goodnight 1998). In Fisher's LST, only mutations generate the diversity on which selection acts, while in Wright's SBT, genetic drift is a decisive component in finding adaptive opportunities (Wade & Goodnight 1998). Accumulating evidence for adaptation by Fisher's LST has been reported in natural systems (Coyne et al. 1997; 2000) but adaptation via Wright's SBT has, to our knowledge, only been demonstrated under laboratory conditions (Wade & Goodnight 1991). Due to the difficulty in demonstrating the entire SBT process within a single system, especially in natural populations, this theory remains highly criticized (Barton 1992; Coyne et al. 1997; 2000).

Aposematic signals are one of the better understood examples of how natural selection can maintain stable phenotypes. Individuals that deviate from the predators' recognized signal suffer increased predation and this frequency-dependent selection would promote uniformity (Ruxton et al. 2004; Sherratt 2008). Paradoxically, impressive spatial variation in aposematic signals have been documented among populations of a variety of organisms (Turner 1971; Jiggins et al. 1997; Symula et al. 2001; Noonan & Gaucher 2006; Wang & Shaffer 2008; Bocak & Yagi 2009; Marek & Bond 2009). Numerous models, including either the LST (Balogh & Leimar 2005) and the SBT (Mallet & Singer 1987; Mallet & Joron 1999; Mallet 2010; Rudh et al. 2007) theories as central mechanisms, have been suggested to explain such spatially structured variations (Brown et al. 1974; Benson 1982; Endler 1982b; Sheppard et al. 1985).

Geographical variations in aposematic signals are frequent in the poison-dart frogs of Northern Peru (Schulte 1999; Symula et al. 2001, 2003; Robert et al. 2006; Brown et al. 2008). For instance, *Ranitomeya imitator* displays highly variable and distinct warning signals among different localities, even at the scale of a few kilometers (Symula et al. 2001; Chouteau et al. 2011). This species is of particular interest because these differences in

warning signals appear to be highly heritable (Schulte 1999; Summer et al. 2004), whereby offspring consistently retain the parental aposematic signal when bred under various environmental conditions.

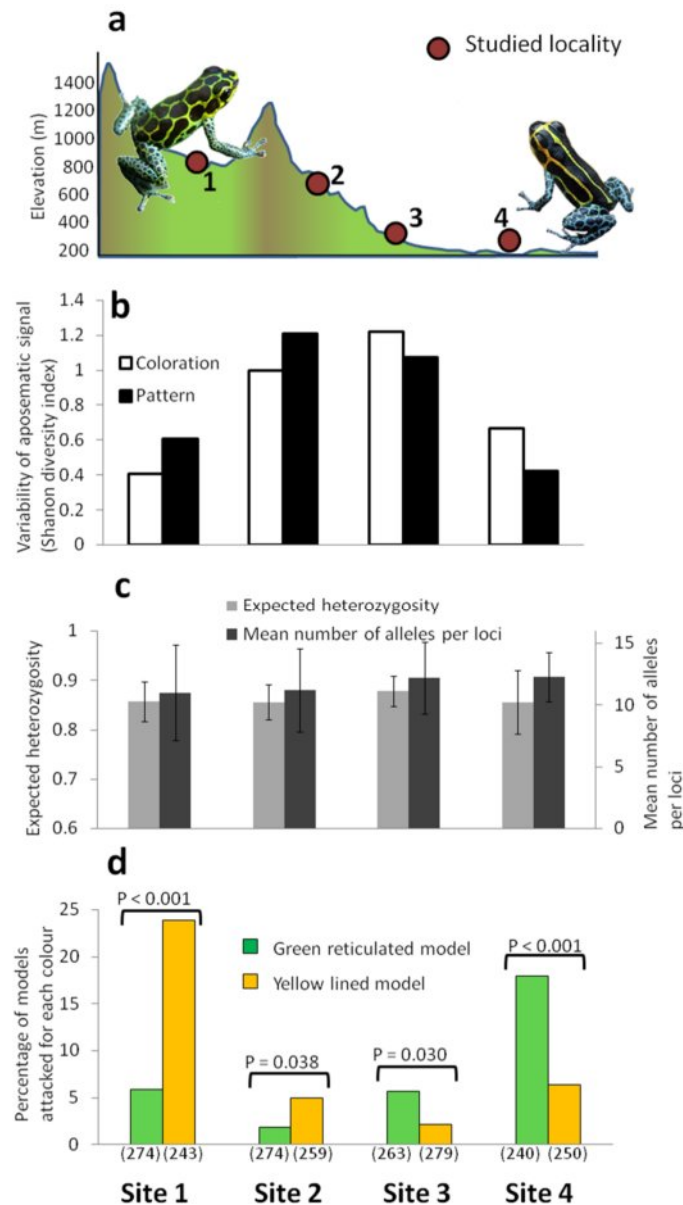
The aim of this study is to assess whether genetic drift is a determinant process in the diversification of aposematic signals. The transient zone between two geographically and phenotypically distinct populations of *R. imitator* provides an exceptional natural system to conduct such a study, as selective pressures are expected to change drastically. The effects of drift and natural selection on phenotypic divergence were assessed using population genetics and predation experiments.

## 5.2 Results

*Ranitomeya imitator* is a small semi-arboreal dendrobatid frog distributed in the Peruvian department of San Martin and Loreto. While this species is principally distributed in the Amazonian lowland where it displays a vivid yellow striped aposematic signal, small phenotypically distinct populations are also found in valleys of higher elevation formed by the Cordillera Escalera (Symula et al. 2001; 2003). Four sites, each separated by *ca.* 6 km, were chosen along an altitudinal transect (Figure 5.1a) covering the transition in aposematic signals from one such higher elevation valley towards the Amazonian lowland. In the two most distant sites (sites 1 and 4) *R. imitator* possesses nearly fixed but distinct aposematic signals (Figure 5.1b; site 1: Shannon diversity index  $H' = 1.069$ , site 4:  $H' = 1.175$ ). In the first site located in the higher elevation valley, *R. imitator* possesses a green reticulated pattern on a black background on the top of the head, dorsum and flanks. The geographical range of this phenotype is relatively small (*ca.* less than 15 km<sup>2</sup>), limited by the mountain ridges of the Cordillera Escalera (Schulte 1999; Symula et al. 2003; Roberts et al. 2006). In the lowland site (site 4), the head, dorsal and flank pattern consists of thin longitudinal yellow stripes on a black background. This phenotype is the most commonly encountered due to its large geographical range (*ca.* 5000+ km<sup>2</sup>) which spreads from the foot of the eastern Cordillera Escalera far into the Amazonian lowland (Schulte 1999; Symula et al. 2003; Roberts et al. 2006).

Sites 2 and 3 were selected in between the other two sites and were located at intermediate elevations inside the only corridor appearing to connect the highland green reticulated phenotype population (site 1) to the Amazonian lowlands (site 4). These sites are characterized by a high diversity of colors and patterns (Figure 5.1b;  $H' = 2.085$  in site 2 and  $H' = 2.097$  in site 3) in comparison to sites 1 and 4 ( $W_{3,132} = 30.18$ ,  $p < 0.001$ ). These phenotypes are however not randomly distributed, since the green reticulated pattern and the yellow striped pattern are predominant in sites 2 and 3 respectively. The habitat of *R. imitator* at these elevations is relatively small and fragmented due to land-use for pasture. As a result, numerous small populations connected by thin corridors of forests inhabit this region.

We first tested the null hypothesis that low (sites 1 and 4) and high (sites 2 and 3) phenotypic diversity was related to demographic processes affecting genetic diversity (Manica et al. 2007). Genetic analyses performed on microsatellite markers revealed that the studied populations display a similar level of genetic diversity, both in term of number of alleles per locus ( $F_{3,32} = 1.43$ ,  $p = 0.250$ ) and heterozygosity ( $F_{3,32} = 0.56$ ,  $p = 0.644$ ; Figure 5.1c). Populations do not significantly differ from mutation-drift equilibrium, providing no evidence of recent bottleneck or expansion ( $p \geq 0.291$  for both SMM and IAM). Consequently, the difference in the aposematic signal's variability is explained neither by the effective population size nor by recent demographic events inferred from neutral genetic diversity.

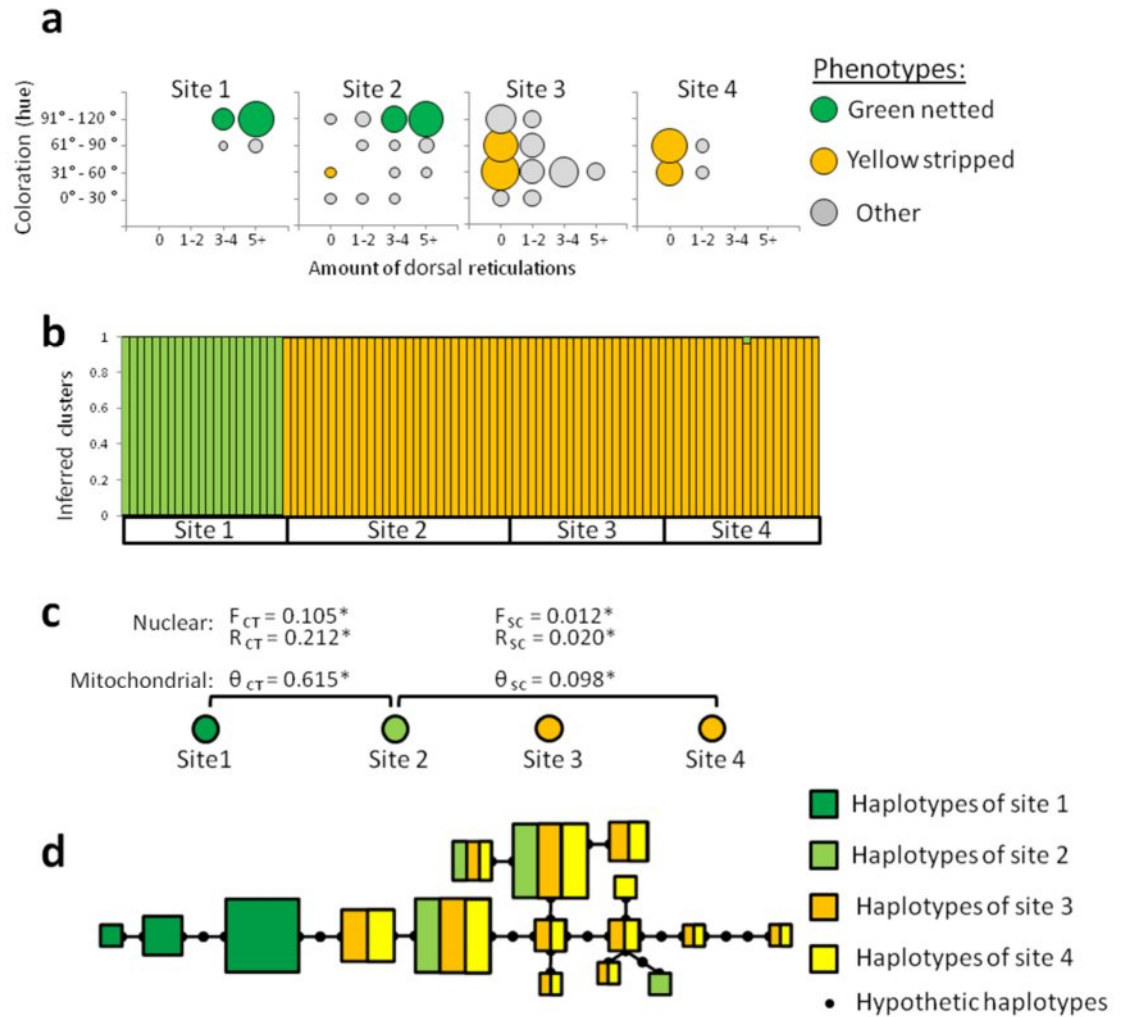


**Figure 5.1:** Phenotypic variability, genetic diversity and predation pressure measured in *Ranitomeya imitator* for the study sites. (a) Topographic profile of the study system with the study sites along the 18 km transect. (b) Phenotypic variation within sites of both aposematic dorsal coloration and pattern measured using the Shannon diversity index. (c) Neutral genetic variation estimated from nine nuclear microsatellites loci in terms of expected heterozygosity and mean number of alleles per loci, and their associated standard deviation. (d) The predation of each aposematic signal measured as the percentage of clay models attacked by avian predators in each site. Probabilities associated with the within site G-test of independence are indicated above the bars and the sample size is indicated below.

An alternative hypothesis to explain the higher phenotypic polymorphism observed would be that sites 2 and 3 are contact zones where hybridization occurs between the two distinct aposematic signals found in the highland and lowland, as has been documented in numerous species of *Heliconius* butterflies (Mallet 1986; Jiggins et al 1997; Joron & Mallet 1998; Merchan 2005). To test this hypothesis we assessed the structure and differentiation of populations using both nuclear and mitochondrial genomes (Figures 5.2b, 5.2c, and 5.2d). Our results clearly show that the highland population (site 1) displaying the fixed green reticulated pattern is currently allopatrically isolated from the other populations. The results obtained from STRUCTURE (Figure 5.2b) reveal that individuals of site 1 clustered together but separately from those of the other sites. These two groups identified by STRUCTURE do not share any mtDNA haplotypes (Figure 5.2d) and partitioning of the genetic variance between both groups measured at both the nuclear ( $R_{CT} = 0.212$ ,  $p < 0.001$ ) and mitochondrial ( $\theta_{CT} = 0.615$ ,  $p < 0.001$ ) genome is extremely high (Figure 5.2c). These results are concordant with field observations that *R. imitator* is continuously distributed from the lowland (site 4) up to 750 m (site 3) into the transient zone, but absent from the Cordillera Escalera ridge separating these populations from the higher elevation valley (site 1). As such, hybridization does not appear to be responsible for the phenotypic diversity.

Mitochondrial diversity of site 2 (4 haplotypes) is lower than the one of site 3 and 4 (10 and 11 haplotypes respectively) and clearly appears to be a subsample of the lower elevation sites (Figure 5.2d). A decrease in the number of haplotypes such as this, combined with phylogeographic studies showing that *R. imitator* originated from the Amazonian lowland (Symula et al. 2003; Roberts et al. 2006) and data on aposematic signal distribution (Symula et al. 2001), suggests that the colonization of the transient zone (sites 2 and 3) occurred recently from the yellow striped *R. imitator* which is widely distributed in the Amazonian lowlands (site 4). Tests for allelic differentiation indicated significant differences in allelic frequencies among sites 2, 3 and 4, but very low levels of differentiation (Figures 5.2b and 5.2c) in accordance with recent divergence (Hardy et al. 2003). These differences are mainly the result of genetic drift as they occurred across the whole genome and SPAGEDI ruled out the significant effect of mutations ( $p \geq 0.142$ ). Moreover, even if measured on only 3 populations, genetic differentiation increases with

distance and this suggests that these populations are connected according to a model of isolation by distance (Wright 1943; Rousset 1997).



**Figure 5.2:** Phenotypic distribution and genetic differentiation measured in *Ranitomeya imitator* for the study sites. (a) Frequency distribution of the different aposematic phenotypic coloration and dorsal patterns found among individuals in the four study sites. (b) Individual assignment among  $K = 2$  clusters using STRUCTURE and (c) the hierarchical partitioning of genetic variance between population groups estimated from nuclear microsatellites and mitochondrial control region; \* indicates a level of significance of  $p < 0.05$ . (d) Minimum spanning tree for mitochondrial control region haplotypes detected in this study. Each box refers to a distinct haplotype and the size represents its relative abundance.

Given similar genetic diversity and the absence of evidence for hybridization, the unusually high diversity of aposematic signals measured in the transient zone (sites 2 and 3) is likely the result of lowered predation which enables the survival of alternative

phenotypes. To assess the effect of selection on aposematic signals we conducted experiments in the habitat using clay models as bait. Frogs were molded and painted to resemble the two distinct fixed warning signals found in the lowlands and highlands (Chouteau & Angers 2011). These experiments (Figure 5.1d) confirmed the presence of significantly higher avian predation in the highland valley (site 1) and Amazonian lowland (site 4); in fact, predation was found to be approximately four times more important than in the transient zone (sites 2 and 3,  $G_3 = 67.15$ ,  $p < 0.001$ ). Additionally, attack frequency reflected the learning experience of the predator community in both high predation sites (sites 1 and 4), whereby the exotic aposematic phenotype was more likely to be attacked by avian visual predators than the local aposematic phenotype ( $G_1 \geq 15.80$ ,  $p < 0.001$ ). Similarly, the most abundant phenotype in each site of the transient zone, and which is most similar to the fixed warning signal found in the neighbouring site, suffered half as many attacks despite lower predation pressures ( $G_1 \geq 4.28$ ,  $p \leq 0.038$ ).

### 5.3 Discussion

The selection pressure on aposematic signals appears to change drastically in both intensity and direction across the studied system. At both extremities, distinct selective environments are the result of a strong localized stabilizing predation pressure (Chouteau & Angers 2011). The combination of alleles resulting in a green reticulated dorsum is advantageous in the highlands (site 1) whereas the yellow striped dorsum is better fitted for the lowlands (site 4). Any unrecognized phenotypes are rapidly eliminated, thus ensuring phenotypically monomorphic populations, an observation consistent with other aposematic systems (Benson 1972; Mallet & Barton 1989; Mallet et al. 1990; Kapan 2001; Langham 2004; Noonan & Comeault 2009). However, this predation pressure clearly decreases in the transient zone (sites 2 and 3) and coincides with an unusually high diversity of phenotypes, with many of these phenotypes not present in either the highland or the lowland sites.

Given a similar effective population size, the negligible effect of mutations, the absence of strong demographic fluctuations and no evidence of hybridization, this unusually high phenotypic diversity is likely the result of this low selection pressure. In the absence of selection in the transient zone, all "aposematic signals" have the same fitness



and the abundance of alleles linked to the genes responsible for the signal will change exclusively at random through genetic drift (Mallet 2010). The effect of mutations can be ruled out since their effect are non significant even for microsatellite loci with mutation rates of higher orders of magnitude (Weber & Wong 1993).

Interestingly, a high proportion of *R. imitator* in site 2 located in the vicinity of the highlands (site 1) displays a green reticulated aposematic signal which is visually similar to the one characterizing the allopatrically isolated highland population (Figure 5.2a). These observations are of particular interest as the *R. imitator* from this site appears to have originated from the populations inhabiting the lowland (site 4) and which displays a fixed yellow striped dorsum. This strongly suggests that the green reticulated pattern from site 2 (and site 3 to a lesser extent) did not originate from site 1 but appeared *de novo* from yellow striped populations.

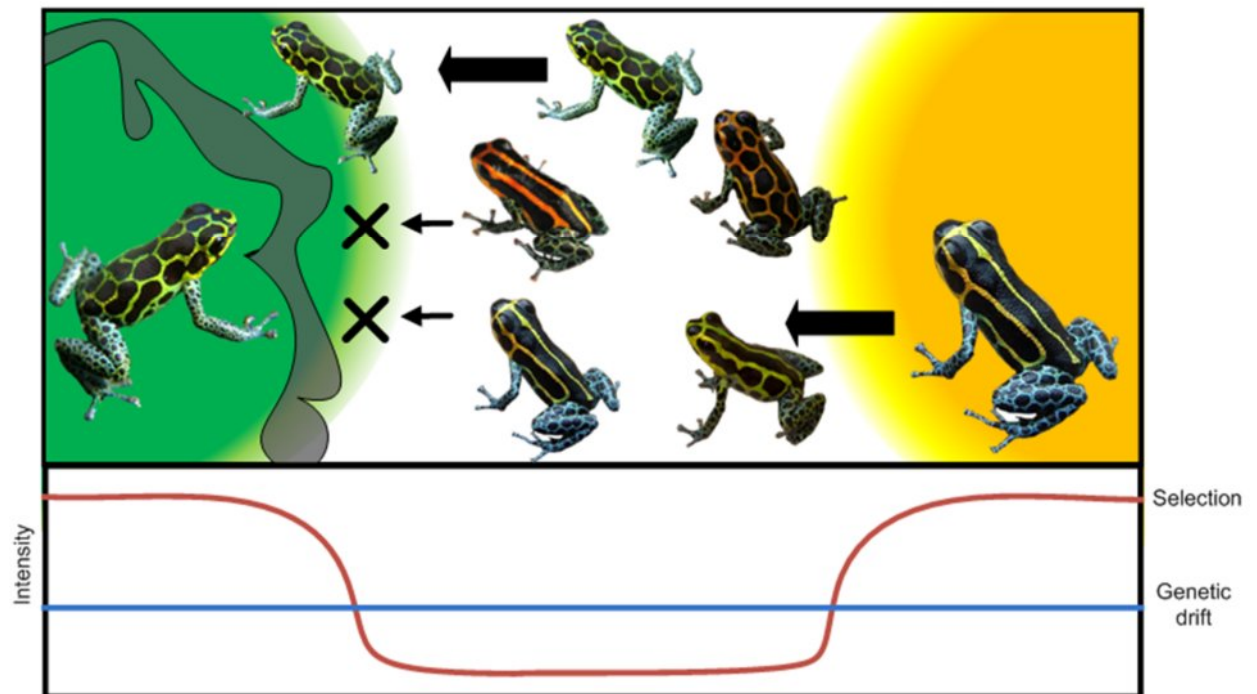
Given the absence of a significant contribution of mutations, we can presume that the diversity of phenotypes present in the transient zone, including the green reticulated phenotype, originates from epistatic combinations of alleles maintained in low frequency in the lowland (site 4). Such alternative phenotypes are strongly counter selected by predators in the lowland (site 4) but they are expected to survive in the absence of selection in the transient zone (site 2 and 3).

The presence of a transient zone (sites 2 and 3) with low selection pressures has enabled populations originating from the monomorphic lowland populations (site 4) to randomly explore the adaptive landscape, including the neighboring highland's (site 1) adaptive peak, by drift. Although not assessed, the exploration of the adaptive landscape is likely facilitated by the presence of numerous small connected populations, as hypothesized by Wright (1932, 1978). As such, a green reticulated phenotype similar to the one recognized by predators in the highland locality has appeared in these regions and has enabled further colonization of the slopes of the Cordillera Escalera (site 2). Other phenotypes are counter selected as they approach this zone of purifying selection surrounding the highland population (Figure 5.1d). Because the green reticulated phenotype is avoided by experienced predators, the alleles responsible for the pattern then increases in frequency by selection and the population becomes locally adapted.

This process (Figure 5.3) is very similar to the two first phases proposed by Wright's SBT (Wright 1932, 1978). During "Phase I", genetic drift enables populations to explore the "adaptive landscape", making it possible for some individuals to leave a given peak, cross valleys of low fitness and reach another "adaptive peak". Selection then enables the population to shift to these alternative fitness peaks in "Phase II". While the interplay of drift and selection appears to explain the differentiation of aposematic signals, this system is however clearly different from Wright's view in that the adaptive landscape is not composed of multiple peaks separated by low fitness valleys (Wright 1978; Coyne et al. 1997). Instead, the adaptive peaks are geographically structured with a major peak in a given locality. As a result, passing from one adaptive peak to the other does not imply a decrease in fitness (i.e. maladaptive combination of genes) as the selection pressures on the given characteristic are reduced, effectively flattening the adaptive landscape. Another major difference with Wright's theory is the absence of phase III which predicts that adaptation will spread to other populations and eventually to the whole species (Wright 1978; Coyne et al. 1997). This is unlikely to occur for an aposematic signal as predators learn to recognize distinct aposematic signals in different habitats, hence preventing the spread of a unique signal (Benson 1972; Mallet & Barton 1989; Kapan 2001; Langham 2001; Noonan & Comeault 2009). However, the novel warning signal could spread at a local scale as long as they are recognized by predators.

Three aspects of this study system enabled us to discard Fisher's LST as being the process responsible for the documented diversification. Firstly, as in other aposematic species, the selective environment changes abruptly and any phenotypes not recognized by predators are rapidly eliminated. As such, the colonization of a novel habitat where the phenotypes become exotic is improbable (Chouteau & Angers 2011), thus preventing the refinement of existing adaptation as preconized by the LST (Fisher 1930; Wade & Goodnight 1991). Under such conditions, the recognized aposematic signal must appear prior to the colonization of these habitats. Secondly, the diversification of aposematic signals in the transient zone is clearly random (Whitlock 1995; Pray & Goodnight 1995, 1997; Bryant & Meffer 1996a, 1996b) as numerous combinations of colors and dorsal patterns are present, including many novel aposematic variants displaying features not found in either the lowland or the highland populations. Under Fisher's LST, constant directional selection would be expected to constrain the aposematic signals along the

yellow striped to green reticulated phenotype continuum (Wade & Goodnight 1998). Finally, because the effect of mutations does not explain the differentiation between populations 2, 3 and 4 even for microsatellites loci presenting a very high rate of mutation, it appears extremely unlikely that novel mutations could explain the observed phenotypic differences (Weber & Wong 1993; Li 1997). The absence of such mutations is in contradiction with the LST, which predicts that novel advantageous mutations will be selected and will spread within the populations (Fisher 1930; Coyne et al. 1997; Wade & Goodnight 1991).



**Figure 5.3:** Schematic representation of the diversification process of aposematic signals in *R. imitator*. The colored areas represent zones of high predation selecting distinct phenotypes and the grey area corresponds to a migration barrier for *R. imitator*. Individuals originating from the monomorphic yellow striped lowland populations (right) colonized (arrows) the transient zone (white area). Under the lowered predation pressure prevalent in these elevations, aposematic signals diversified due to genetic drift. Among the novel signals, the green reticulated phenotype which is recognized by predators (left) enabled the further colonization of the system, while other signals are highly counter selected (X). Below the figure is a schematic representation of the relative intensity of selection compared to genetic drift.

Previous studies have shown how spatially localized selection by naïve predators can generate and maintain a mosaic of aposematic signals (Noonan & Comeault 2009; Borer et al. 2010; Chouteau & Angers 2011). Simulations performed with multiple

phenotypes randomly distributed in a given system resulted in patches of fixed but distinct phenotypes (Sherratt 2006). This initial distribution of multiple phenotypes is similar to the one observed in the transient zone. The present system contrasts with these simulations in that the predators (site 1) are already experienced in avoiding a given phenotype, enabling the population of site 2 to converge towards the aposematic signal present in site 1. This process is similar to the theory of advergence proposed for Müllerian mimicry (Mallet 2001), suggesting that if relative abundance of the two species is different, selection pressures on the rarer species to resemble the abundant form might occur. Such advergence is considered more likely when one species' aposematic signal is already established and avoided by predators before the arrival of an initially rarer second species (Mallet 2001; Symula et al. 2001; Bocak & Yagi 2009).

In summary, we show that the interactions between drift and spatial variation in the intensity of selection are facilitating phenotypic divergence and local adaptation. This study provides further evidence for the importance of drift, as emphasized by Wright's SBT, in explaining how populations have evolved in different selective environments.

## **5.4 Materials and Methods**

### **Sampling**

The field experiments were conducted in the department of San Martin (Peru) during the beginning of the rainy season (November 2009). Four sites were chosen along an altitudinal transect for this study: site 1 (S 06°25'17.0'' W 076°17'28.4'' alt. 514 m), site 2 (S 06°22'40.7'' W 076°17'04.4'' alt. 437m), site 3 (S 06°19'58.4'' W 076°17'00.1'' alt. 268 m) and site 4 (S 06°17'23.0'' W 076°13'43.9'' alt. 192 m).

### **Phenotypic variability**

For each site a minimum of 30 *R. imitator* individuals were collected and positioned over a millimeter grid paper next to a black-grey-white card for color standardization. Each individual was then digitally photographed under standardized conditions. The individual

photographs were corrected for ambient light color in reference to the black-grey-white standard in the background. The dominant hue, from the HSB (hue, saturation, and brightness) domain, was used to quantify coloration of the aposematic signal (Robertson & Robertson 2008) using ImageJ version 1.40g (Abramoff et al. 2004). Each individual was then assigned to one of the 4 following qualitative bins based on their hue: dark orange ( $0^{\circ}$ - $30^{\circ}$ ), light orange ( $30^{\circ}$ - $60^{\circ}$ ), yellow ( $61^{\circ}$ - $90^{\circ}$ ) and green ( $91^{\circ}$ - $120^{\circ}$ ). Dorsal patterns were also characterized. The dorsal pattern in the studied sites always consisted of three well separated longitudinal stripes with different degrees of reticulation between them. Each photographed individual was assigned to a qualitative bin based on the amount of reticulation: no reticulation (0), slightly reticulated (1-2), reticulated (3-4) and highly reticulated (5+). Aposematic variability among each population was measured using the Shannon diversity index ( $H'$ ) and comparison of variance between sites was assessed using Levene's test for equality of variances (W).

### **Prediction one: Test of demographic processes**

To test the null hypothesis that phenotypic diversity is related to demographic processes affecting genetic diversity, a minimum of 20 individuals per site were genotyped using nine microsatellite loci: RimiA06, RimiA07, RimiB01, RimiB02b, RimiB07b, RimiB11, RimiC05b, Rimi E02b, RimiF06 (Brown et al. 2009). The neutral genetic diversity of each site was assessed using the expected heterozygosity and mean number of alleles per locus, measured using GENETIX and compared between sites with ANOVA after verifying for the homogeneity of variances. The presence of past demographic processes was assessed under both IAM and SMM models using the program BOTTLENECK (Cornuet & Luikart 1996).

### **Prediction two: Test of hybridization**

To test whether the higher phenotypic polymorphism observed in the transient zone is caused by hybridization between the two distinct aposematic signals found in the highland and lowland, the populations' structure and differentiations were assessed. Test of

exact population differentiation was performed using GENEPOP (Raymond & Rousset 1995) and the relevance of specific population genetic differentiation metrics ( $F_{ST}$  vs  $R_{ST}$ ) was tested using SPAGeDI (Hardy & Vekemans 2002). STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al. 2000) was used without prior population information to confirm population structure. Runs were performed with a burn-in length and MCMC of 100,000 generations and 10 runs were performed for  $K = 2$  to 5. The best number of clusters  $K$  was determined *a posteriori* (Evanno et al. 2005). We also used the mitochondrial control region to assess the degree of population divergence. Primers were designed on *Oophaga pumilio* (previously called *Dendrobates pumilio*) sequences (Wang & Shaffer 2008). The primers 5'-AATGTATATGCCATTATC-3' and 5'-GAAATATTATAGACCTATATC-3' successfully amplified a segment of 274 bp and sequence alignment was performed using CLUSTALW (Larkin et al. 2007). Partition of the genetic diversity within and among populations was evaluated with  $\Phi_{ST}$  and a minimum spanning network was inferred from the observed haplotypes using ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al. 2005). Hierarchical Partitioning of genetic variance between groups previously identified using STRUCTURE was assessed using ARLEQUIN.

### **Prediction three: Test of predation**

To test if lowered predation enables high phenotypic diversity, 300 clay models per aposematic phenotype (i.e. 600 models per site) were randomly secured on understory leaves using toothpicks in all four sites. The models were left in each site 72 hours before collection. Only predation marks left by avian predators on these malleable models were defined as an attack. Models not recovered or destroyed by ants, roaches and unknown assailants were scored as missing and excluded from analysis (Chouteau & Angers 2011). The G-test of independence was used to compare predation pressure among and within sites.

### **Acknowledgements:**

We thank M. McClure, D. Cossios, V. Morales, K. Summers, J. Brown, F. Cyr, R. Massicotte, C. Leung, M. Prud'homme. Funding was provided by the Natural Sciences and

Engineering Research Council scholarship (NSERC) and the Group of Interuniversity research in limnology and aquatic environment (GRIL) to MC. Collecting and export permits for Peru were provided by the Instituto Nacional de Recursos Naturales: permits nº 005-2008-INRENA-IFFS-DCB, nº 0122-2010-AG-DGFFS-DGEFFS and CITES nº 11067.

## Chapitre 6

### Conclusion générale

Tout au long de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la grande diversité des signaux aposématiques observés chez *Ranitomeya imitator* (Dendrobatidae), une petite grenouille péruvienne connue pour ses relations mimétiques avec d'autres espèces sympatriques du genre *Ranitomeya* (Symula et al. 2001). Cette thèse de doctorat aura permis une meilleure compréhension des processus évolutifs menant au phénomène d'adaptation locale. Plus précisément, nos travaux ont permis de mettre en doute les prémisses en faveur du processus d'advergence phénotypique dans un cadre de mimétisme müllérien. Nous avons également documenté comment des pressions de sélection localisées peuvent maintenir l'organisation spatiale des adaptations locales. Finalement, cette étude a permis de démontrer comment l'alternance spatiale entre les processus évolutifs neutres et la sélection naturelle peut mener à la diversification adaptative.

### Le développement de marqueurs génétiques microsatellites

En amont du travail réalisé dans le cadre de cette thèse, des marqueurs microsatellites ont été développés en collaboration avec deux laboratoires américains, afin d'étudier la structure génétique des populations des différentes espèces de *Ranitomeya* de notre système d'étude. Ces locus, étant non-codants (non influencés par la sélection) et démontrant un très grand polymorphisme, s'avèrent idéaux dans l'étude des processus démographiques (Weber & Wong 1993).

Des marqueurs pour 11 locus chez *R. imitator*, et 10 locus chez *R. ventrimaculata* et *R. variabilis* ont été mis au point (Brown et al. 2009). Dans le cadre de cette thèse, 9 locus chez *R. imitator*, et 4 chez *R. ventrimaculata* et *R. variabilis* ont été sélectionnés pour leur polymorphisme élevé, permettant de mesurer précisément les différents paramètres génétiques des populations d'intérêt. Également, afin d'explorer les relations



phylogénétiques existant entre les différentes espèces et populations de *Ranitomeya*, des marqueurs de la région de contrôle de la mitochondrie ont été développés. Cette région de la mitochondrie démontre un polymorphisme beaucoup plus important que les locus utilisés dans les études antérieures, permettant ainsi de mettre en évidence des relations phylogénétiques plus fines.

Bien que cette question n'ait pas été abordée dans cette thèse, il est important de noter que les Dendrobatidae sont grandement menacés (CITES appendice I et II), et particulièrement les espèces du Pérou. Le braconnage intensif ayant pour motif de fournir ces amphibiens colorés à un marché terrariophile mondial est la principale menace pesant sur ces espèces charismatiques (Twoney & Brown 2006). La disponibilité de marqueurs microsatellites et mitochondriaux permettra de quantifier l'impact du braconnage et de mettre sur pied diverses initiatives de conservation, tout en permettant un meilleur suivi et/ou gestion de ces espèces à risque.

### **Convergence ou advergence phénotypique chez *Ranitomeya*?**

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressé à la relation mimétique entre *R. imitator*, *R. variabilis* et *R. ventrimaculata* (Symula et al. 2001). Cette relation de mimétisme müllérien est de très grande importance puisque sa description a mis fin à près d'un siècle de débats concernant la possibilité que deux espèces aposématiques convergent vers un signal aposématique commun (Dixey 1909; Müller 1978) *versus* la possibilité qu'une seule des deux espèces converge vers le signal de la seconde espèce (i.e. advergence; Marshall 1908; Fisher 1927, 1930; Ritland & Brower 1999; Mallet 2001). En effet, *Ranitomeya imitator* est considéré comme le principal exemple empirique illustrant le phénomène d'advergence phénotypique (Symula et al. 2001; Ruxton 2004; Sherratt 2008): *R. imitator* imiterait plusieurs espèces modèles distinctes (i.e. *R. ventrimaculata*, *R. variabilis* et *R. summersi*) dans différentes zones géographiques. Cette conclusion était appuyée par la faible distance génétique et la grande variabilité phénotypique entre les morphes mimétiques de *R. imitator* comparativement aux espèces modèles, suggérant ainsi que *R. imitator* aurait colonisé les habitats après les espèces modèles, et de ce fait, aurait adopté leur signal aposématique respectif (Symula et al. 2001).

Le réexamen de ce système d'étude, réalisé sur un plus grand nombre d'individus et en utilisant des techniques plus précises, remet sérieusement en doute les prémisses de Symula et al. (2001) concernant l'advergence phénotypique. En démontrant que les deux espèces modèles, *R. ventrimaculata* et *R. variabilis*, sont très probablement des populations de la même espèce, il semblerait que cette espèce démontre alors une variabilité phénotypique similaire à celle de *R. imitator*. De fait, au lieu d'avoir une espèce polymorphe (i.e. *R. imitator*) imitant deux espèces distinctes monomorphes (i.e. *R. ventrimaculata* et *R. variabilis*) comme le suggérait Symula et al. (2001), nous avons une situation où deux espèces (i.e. *R. imitator* et *R. ventrimaculata/variabilis*) démontrent le même niveau de variation phénotypique entre des habitats distincts.

De même, la différenciation génétique plus élevée entre les populations phénotypiquement distinctes de *R. imitator* comparativement à celle de *R. ventrimaculata/variabilis* est contradictoire avec les observations de Symula et al. (2001) qui leur ont permis de conclure à la présence du processus d'advergence. Cette contradiction provient probablement du très petit nombre d'échantillons utilisés initialement par Symula et al. (2001), combiné à la très forte diversité génétique des espèces étudiées.

Bien que la forte différenciation génétique mesurée entre les populations de *R. imitator* puisse suggérer que *R. imitator* soit l'espèce modèle et non celle qui imite, nous tenons à mettre en garde contre une telle interprétation. En effet, en l'absence d'une bonne compréhension du patron de colonisation des différents habitats par les deux espèces, il est impossible de déterminer la chronologie de colonisation des habitats, et de ce fait, la direction de la relation mimétique.

Ainsi, nos résultats invalident les données empiriques ayant précédemment permis de conclure que le processus d'advergence phénotypique prévaut chez *R. imitator*. Cette étude est de grande importance, car ce système d'étude était considéré comme le meilleur exemple en faveur de l'advergence. Par contre, il est important de noter que nos résultats ne remettent pas en cause l'hypothèse de l'advergence phénotypique dans un cadre de mimétisme müllérien. À l'exception des évidences discutées dans le chapitre 5 de cette thèse, aucune autre preuve empirique n'existe, autant pour la théorie de la convergence que pour celle de l'advergence phénotypique. Ainsi, cette étude devrait raviver les discussions

concernant la direction des relations mimétiques dans un cadre de mimétisme müllérien. Une meilleure compréhension de ces relations pourrait entre autres permettre de différencier les dynamiques évolutives des mimétismes müllérien et batésien, de mieux comprendre les processus de différenciation adaptative et, possiblement, de cibler les causes du polymorphisme.

### **Le rôle des prédateurs dans le maintien du polymorphisme géographique**

Dans un second temps, nous avons confirmé l'importance des prédateurs dans le maintien des mosaïques géographiques de signaux aposématiques. Afin de réaliser cette étude, des figurines en pâte à modeler représentant les différents phénotypes d'intérêt ont été déposées dans l'habitat. Ces figurines, étant malléables, ont permis de récolter les marques laissées par les différents types de prédateurs et ainsi mesurer le taux de prédation (Brodie III 1993; Kuchta 2005; Saporito et al. 2007; Noonan & Comeault 2009).

En plus de confirmer empiriquement que les couleurs vives caractérisant les *Ranitomeya* sont des signaux aposématiques (Symula et al. 2001), nos résultats ont mis en évidence l'action localisée et homogénéisatrice des prédateurs sur les signaux aposématiques de leurs proies potentielles. Les prédateurs, principalement des oiseaux, ont démontré une réelle capacité à discriminer entre différents signaux aposématiques. Cette discrimination étant basée sur l'expérience passée, deux signaux d'avertissement ne conféreront pas le même avantage dans une communauté de prédateurs définis. En effet, alors que le signal que la communauté de prédateurs a appris à reconnaître sera avantageux, un nouveau signal sera désavantageux puisqu'il ne sera pas initialement reconnu comme étant toxique et de plus il sera plus facilement repérable relativement à une espèce cryptique. Alors que les signaux aposématiques sont soumis à une sélection fréquence dépendante positive (Müller 1978; Sherratt 2008), le signal aposématique reconnu représente une véritable adaptation locale.

Une telle variation spatiale au niveau des pressions de sélection exercées sur les signaux aposématiques aura comme effet de contraindre la migration entre les populations phénotypiquement distinctes, car les migrants seront rapidement éliminés. Ces mêmes

pressions de sélection empêcheront également le maintien de nouveaux phénotypes (i.e. mutations et/ou nouvelles combinaisons épistatiques) n'étant pas reconnus par les prédateurs. Ainsi, une structure des signaux aposématiqués spatialement et temporellement stable devrait être maintenue.

Alors que la structure géographique des signaux aposématiqués est maintenue par les communautés de prédateurs, les facteurs responsables du maintien de ces communautés sont peu compris. Il est possible que les barrières géographiques délimitent les différentes communautés de prédateurs, puisqu'il a été souligné à de nombreuses reprises que les zones de contact entre deux signaux aposématiqués distincts coïncident très souvent avec des montagnes ou des grands fleuves (Sherratt et al. 2008). Dans notre système d'étude, les hautes crêtes de la Cordillera Escalera séparent les différents phénotypes aposématiqués des espèces du genre *Ranitomeya* (*R. imitator*, *R. ventrimaculata/variabilis* et *R. fantastica*), mais également ceux d'un grand nombre d'espèces de lépidoptères (Mallet & Barton 1989; Whinnett et al. 2005). Une telle concordance souligne le rôle possible des barrières dans la mise en place initiale des systèmes aposématiqués (Sheppard et al. 1985), ainsi que dans le maintien actuel des communautés de prédateurs. Pourtant, les simulations réalisées par Sherratt (2006; 2008) démontrent qu'elles ne sont pas forcément nécessaires puisque la structure géographique pourrait résulter d'une co-structuration prédateurs-proies. Dans ce cas, il deviendrait très désavantageux pour le prédateur d'explorer de nouveaux habitats où les signaux aposématiqués ne sont plus reconnus.

## **La diversification des signaux aposématiqués**

Finalement, nous nous sommes intéressé aux processus évolutifs expliquant la diversification des signaux aposématiqués. Comme mentionné précédemment, les signaux aposématiqués sont soumis à de hautes pressions de sélection conduisant à une quasi-totale uniformité. De telles pressions ne devraient pas permettre la diversification des signaux aposématiqués puisque tout nouveau signal sera rapidement éliminé (Ruxton et al. 2004). Curieusement, *R. imitator* et de nombreuses autres espèces aposématiqués démontrent une grande variabilité de signaux aposématiqués géographiquement structurés (Turner 1971; Jiggins & McMillan 1997; Zrzavy & Nedved 1999; Symula et al. 2001; Noonan & Gaucher

2006; Wang & Shaffer 2008; Bocak & Yagi 2009; Marek & Bond 2009). Afin de comprendre comment la diversification adaptative des signaux aposématiqués survient, nous nous sommes intéressés à la zone de transition entre deux signaux distincts. Cette étude audacieuse a permis de démontrer, et ceci pour la première fois, le processus évolutif du "*Shifting Balance*" proposé par Sewall Wright (1932) dans un système naturel. Ce processus en 3 phases, combinant la stochasticité évolutive et la sélection naturelle (Wright 1932), avait jusqu'à maintenant uniquement été démontré en laboratoire (Wade & Goodnight 1991). En l'absence d'exemple empirique démontrant le potentiel évolutif de ce processus dans les systèmes naturels, cette théorie a été et reste grandement critiquée (Coyne et al. 1997; 2000). Ceci d'autant plus que la très grande majorité des situations naturelles d'adaptation peut être expliquée via la théorie de sélection de masse de Fisher (Coyne et al. 1997).

En effet, l'analyse approfondie de notre système d'étude a révélé qu'entre les zones géographiques où les deux signaux aposématiqués sont uniformes, il existe une zone caractérisée par une très haute variabilité phénotypique. L'utilisation des méthodes de génétique des populations combinées à l'utilisation des figurines en pâte à modeler a permis d'expliquer l'origine de cette variabilité: les prédateurs étant peu abondants, leur action purificatrice ne peut contrecarrer les effets des processus évolutifs neutres (i.e. dérive génétique et mutations) agissant naturellement dans les populations (Phase I du processus du modèle ).

L'absence des pressions de sélection au niveau temporel et/ou spatial, particulièrement dans de petites populations, a pour résultat de permettre l'apparition et le maintien de nouveaux phénotypes aposématiqués. Si ces nouveaux phénotypes sont susceptibles d'être évités par les prédateurs des régions adjacentes, ceux-ci permettront la colonisation de nouveaux habitats, où un signal unique sera alors fixé par les prédateurs (phase II du modèle).

Conséquence inattendue de cette étude, nous avons ainsi démontré qu'une telle zone permettait, lors de sa colonisation, une diversification pouvant conduire à l'advergence phénotypique. En effet, la zone de transition permet aux populations provenant d'une zone de haute sélection et de faible diversité phénotypique (population ayant un phénotype jaune ligné) de se diversifier et ainsi démontrer un haut polymorphisme. Dans cette zone de faible

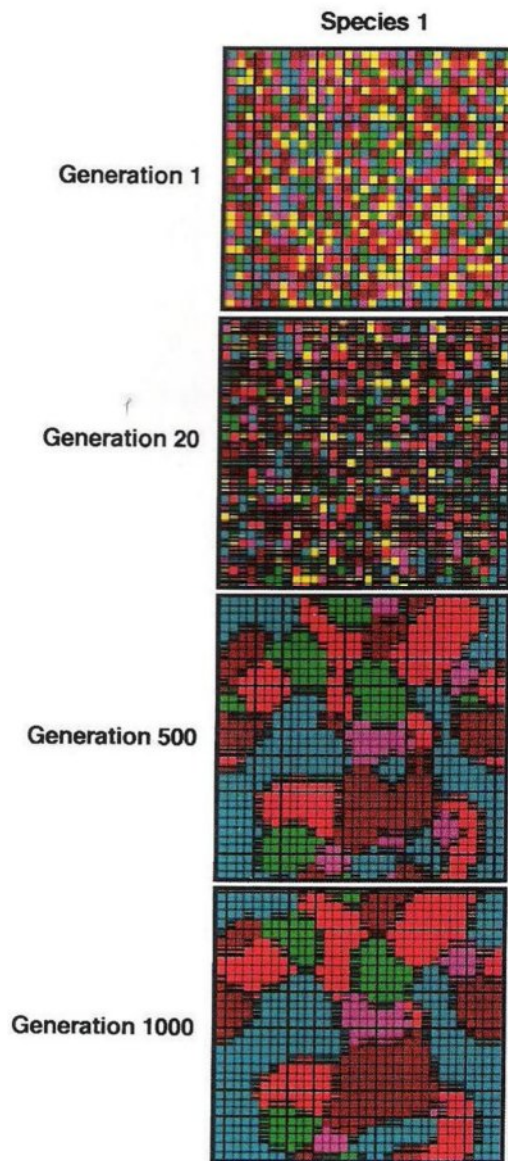
pression de prédation, il est apparu, parmi tous les nouveaux signaux aposématiques, des individus ayant un phénotype visuellement identique à celui de la population adjacente (phénotype vert réticulé). Ces individus étant reconnus comme toxiques par la communauté de prédateurs adjacente sont donc avantagés, et cela a permis la colonisation et l'établissement de populations dans de nouveaux habitats. Ainsi, en ayant advergé vers un signal aposématique efficace, ces nouvelles populations profitent de l'éducation préalablement acquise des prédateurs. Ce dynamisme évolutif, très similaire à ce qui est attendu dans le cas du mimétisme batésien, est ici officiellement documenté pour la première fois et il restera à vérifier s'il est largement répandu.

Par contre, le processus du "*shifting balance*" que nous avons mis en évidence dans le cadre de ces travaux de thèse est légèrement différent de celui décrit par Wright (1932). Alors que ce dernier met l'emphasis sur une structure en métapopulations de petite taille afin d'explorer le paysage adaptatif lors de la phase I, nous démontrons qu'une absence de pressions de sélection aura un effet similaire. Une telle situation aplatit le paysage adaptatif et permet l'exploration, par la population, de phénotypes alternatifs (i.e. nouvelles combinaisons de gènes) sans diminution de la valeur adaptative.

Il est à noter que ces deux mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs puisque la combinaison des deux facilitera l'exploration du paysage adaptatif: une petite taille de population aura comme effet d'augmenter l'effet de la dérive génétique et donc l'exploration du paysage adaptatif, tandis que l'absence de prédateur permettra aux nouveaux phénotypes de se maintenir au fil des générations.

Bien que nous soyons parvenus à déterminer précisément comment la diversification peut survenir dans un contexte d'advergence phénotypique, le processus ayant permis la diversification initiale des signaux aposématiques reste néanmoins un mystère. Toutefois, les différents éléments de cette thèse permettent de dresser un portrait hypothétique de ce processus. En effet, nos résultats permettent de confirmer et de compléter les simulations antérieurement réalisées par Sherratt (2006; 2008). Celui-ci démontre théoriquement que pour obtenir une mosaïque géographique de signaux aposématiques à partir d'une situation où différents phénotypes sont distribués de façon homogène, il ne suffit que d'une forte sélection fréquence dépendante positive et localisée

(voir Figure 6.1). Ainsi, la stochasticité de la distribution initiale des phénotypes déterminera le phénotype qui sera fixé dans chacune des parcelles de cette mosaïque.



**Figure 6.1:** Formation de la mosaïque spatiale des signaux aposématifs présentée par Sherratt (2006). Les populations d'une espèce aposématique, démontrant 10 phénotypes, sont distribuées aléatoirement dans une grille (50 x 50 cellules). À chaque génération, les individus peuvent se disperser (à un faible taux) dans les cellules adjacentes, la communauté de prédateurs local élimine un nombre déterminé de chacun des phénotypes dans chacune des cellules jusqu'à atteindre un seuil où le phénotype est évité, et les proies se reproduisent. Bien que débutant avec une distribution aléatoire des phénotypes aposématifs, une structure spatiale des signaux aposématifs apparaît rapidement. Figure modifiée de Sherratt (2006).

Alors que la sélection fréquence dépendante positive (Benson 1972; Mallet & Barton 1989; Kapan 2001; Ihalainen 2008) et localisée (Mallet & Barton 1989, Noonan & Comeault 2009; Borer et al. 2010; chapitre 4) était démontrée ou facilement explicable, ce modèle ne parvenait pas à expliquer comment une situation initiale de polymorphisme aposématique pouvait survenir. En démontrant (chapitre 5) que l'absence de prédateurs permet la diversification et la cohabitation de différents signaux aposématiques, nous expliquons la situation de départ du modèle de Sherratt (2006). Bien que tous les éléments de ce modèle (i.e. polymorphisme initial, pressions de sélection fréquence dépendante et localisée) n'aient jamais été démontrés dans un même système, les différents éléments que cette thèse apporte à ce modèle le rendent beaucoup plus robuste.

Pour conclure, cette thèse aura permis de mettre en évidence comment l'hétérogénéité spatiale des processus évolutifs neutres et la sélection naturelle peut mener à la diversification adaptative. Ces processus sont d'une grande importance en écologie et en biologie évolutive, car ils pourraient, *a priori*, expliquer un grand nombre d'adaptations locales observées dans les populations naturelles.



## Références

- Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36-42.
- Abrams PA (1991) Life history and the relationship between food availability and foraging effort. *Ecology* **72**, 1242-1252.
- Alatalo RV, Mappes J (1996) Tracking the evolution of warning signals. *Nature* **382**, 708-710.
- Avise JC (2004) 'Molecular markers, natural history and evolution, 2nd edition.' (Sinauer Associates, Sunderland).
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 489-522.
- Barton NH (1992) On the spread of new gene combinations in the third phase of Wright's shifting balance. *Evolution* **46**: 551-557.
- Balogh ACV, Leimar O (2005) Müllerian mimicry: an examination of Fisher's theory of gradual evolutionary change. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 2269-2275.
- Bates HW (1862) Contribution to an insect fauna of the Amazon valley. Lepidoptera: Heliconidae. *Transactions of the Linnean Society of London* **23**, 495-566.
- Beatty CD, Beirincx K, Sherratt TN (2004) The evolution of Müllerian mimicry in multispecies communities. *Nature* **431**, 63-67.
- Benson WW (1971) Evidence for the evolution of unpalatability through kin selection in the Heliconiinae (Lepidoptera). *The American Naturalist* **105**, 213-226.
- Benson WW (1972) Natural selection for Müllerian mimicry in *Heliconius erato* of Costa Rica. *Science* **176**, 936-939.

- Benson WW (1982) Alternative models for infrageneric diversification in the humid tropics: tests with passion vine butterflies. In 'Biological Diversification in the Tropics'. (Ed. GT Prince) pp. 608-640. (Columbia University Press: New York).
- Blondel J, Thomas DW, Charmantier A, Perret P, Bourgault P, Lambrechts MM (2006) A thirty-year study of phenotypic and genetic variation of blue tits in Mediterranean habitat mosaics. *Bioscience* **56**, 661-673.
- Bocak L, Yagi T (2009) Evolution of mimicry patterns in *Metriorrhynchus* (Coleoptera: Lycidae): the history of dispersal and speciation in Southeast Asia. *Evolution* **64**, 39-52.
- Borer M, van Noort T, Rahier M, Naisbit RE (2010) Positive frequency-dependent selection on warning color in alpine leaf beetles. *Evolution* **64**, 3269-3633.
- Brodie III ED (1993) Differential avoidance of coral snake banded patterns by free-ranging avian predators in Costa Rica. *Evolution* **47**, 227-235.
- Brower AVZ (1996) Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* butterflies: A phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* **50**, 195-221.
- Brown JL, Chouteau M, Glenn T, Summers K (2009) The development and analysis of twenty-one microsatellite loci for three species of Amazonian poison frogs. *Conservation Genetics Resources* **1**, 149-151.
- Brown JL, Twomey E, Pepper M, Rodriguez MS (2008) Revision of the *Ranitomeya fantastica* species complex with description of two new species from Central Peru (Anura: Dendrobatidae). *Zootaxa* **1823**, 1-24.
- Brown KS, Sheppard PM, Turner JRG (1974) Quaternary refugia in tropical America: evidence from race formation in *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **187**, 369-378.
- Bryant EH, Meffert LM (1996a) Morphometric differentiation in serially bottlenecked populations of the housefly. *Evolution* **50**, 935-940.
- Bryant EH, Meffert LM (1996b) Nonadditive genetic structuring of morphometric variation in relation to a population bottleneck. *Heredity* **77**, 168-176.

- Chiari Y, Vences M, Vieites DR, Rabemananjara F, Bora P, Ravoahangimalala OR, Meyer A (2004) New evidence for parallel evolution of colour patterns in Malagasy poison frogs (*Mantella*). *Molecular Ecology* **13**, 3763-3774.
- Chouteau M, Angers B. (2011) The role of predators in maintaining the geographic organization of aposematic signals. *The American Naturalist*. **In press**.
- Chouteau M, Summers K, Morales V, Angers B (2011) Advergence in Müllerian mimicry: the case of the poison-dart frogs of Northern Peru revisited. *Biology Letters* **published online 16 March 2011**.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Coyne JA, Barton NH, Turelli M (1997) Perspective: A critique of Sewall Wright's shifting balance theory of evolution. *Evolution* **51**, 643-671.
- Coyne JA, Barton NH, Turelli M (2000) Is Wright's shifting balance process important in evolution? *Evolution* **54**, 306-317.
- Dixey FA (1909) On Müllerian mimicry and diaposematism. A reply to Mr GAK Marshall. *Transactions of the Entomological Society of London* **XXIII**, 559-583.
- Dumbacher JP, Fleischer RC (2001) Phylogenetic evidence for colour pattern convergence in toxic pitohuis: Müllerian mimicry in birds? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**, 1971-1976.
- Endler JA (1982a) Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. *The American Zoologist* **22**, 441-452.
- Endler JA (1982b) Pleistocene forest refuges: fact or fancy? In 'Biological Diversification in the Tropics'. (Ed. GT Prince) pp. 641-657. (Columbia University Press: New York).
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.

- Excoffier L (2001) Analysis of population subdivision. In 'Handbook of statistical genetics'. (Eds DJ Balding, MJ Bishop, C Cannings) pp. 271-308.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Fisher RA (1927) On some objections to mimicry theory: statistical and genetic. *Transactions of the Entomological Society of London* **75**, 269-278.
- Fisher RA (1930) 'The genetical theory of natural selection.' (Clarendon press: Oxford).
- Flanagan NS, Tobler A, Davison A, Pybus OG, Kapan DD, Planas S, Linares M, Heckel D, McMillan WO (2004) Historical demography of Mullerian mimicry in the neotropical *Heliconius* butterflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9704-9709.
- Garant D, Forde SE, Hendry AP (2007) The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. *Functional Ecology* **21**, 434-443.
- Glenn TC (2005) Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* **395**, 202-222.
- Glenn TC, Schable NA (2009) Glenn\_Schnable\_update2.pdf Available via download [http://www.uga.edu/srel/DNA\\_Laboratory/dna\\_protocols.htm](http://www.uga.edu/srel/DNA_Laboratory/dna_protocols.htm).
- Greenwood JJD, Cotton PA, Wilson DM (1989) Frequency-dependent selection on aposematic prey: some experiments. *Biological Journal of the Linnean Society* **36**, 213-226.
- Grobman AB (1978) An alternative solution to the coral snake mimic problem. *Journal of Herpetology* **12**, 1-11.
- Halliburton R (2004) 'Introduction to population genetics.' (Pearson Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ ).
- Haper GR, Pfennig DW (2007) Mimicry on the edge: why do mimics vary in resemblance to their model in different part of their geographical range? *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**, 1955-1961.

- Hardy OJ, Charbonnel N, Freville H, Heuertz M (2003) Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* **163**, 1467-1482.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**, 618-620.
- Hendry AP, Taylor EB, McPhail JD (2002) Adaptive divergence and the balance between selection and gene flow: Lake and stream stickleback in the misty system. *Evolution* **56**, 1199-1216.
- Ihalainen E, Lindstrom L, Mappes J, Puolakkainen S (2008) Can experienced birds select for Müllerian mimicry? *Behavioral Ecology* **19**, 362-368.
- Jiggins CD, McMillan WO (1997) The genetic basis of an adaptive radiation: warning colour in two *Heliconius* species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **264**, 1167-1175.
- Jiggins CD, McMillan WO, King P, Mallet J (1997) The maintenance of species differences across a *Heliconius* hybrid zone. *Heredity* **79**, 495-505.
- Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL, Mallet J (2001) Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature* **411**, 302-305.
- Joron M, Iwasa Y (2005) The evolution of a Müllerian mimic in a spatially distributed community. *Journal of Theoretical Biology* **237**, 87-103.
- Joron M, Mallet JLB (1998) Diversity in mimicry: paradox or paradigm? *Trends in Ecology & Evolution* **13**, 461-466.
- Kapan DD (2001) Three-butterfly system provides a field test of Müllerian mimicry. *Nature* **409**, 338-340.
- Kikuchi DW, Pfennig DW (2010) Predator cognition permits imperfect coral snake mimicry. *The American Naturalist* **176**, 830-834.

- King RB, Lawson R (1995) Color-pattern variation in Lake Erie water snakes: the role of gene flow. *Evolution* **49**, 885-896.
- Krebs CJ (2001) 'Ecology.' (Benjamin Cummings: San Francisco).
- Kutcha SR (2005) Experimental support for the aposematic coloration in the salamander *Ensatina eschscholtzii xanthoptica*: Implication for mimicry of pacific newts. *Copeia* **2005**, 265-271.
- Langham GM (2004) Specialized avian predators repeatedly attack novel color morphs of *Heliconius* butterflies. *Evolution* **58**, 2783-2787.
- Larkin MA, Blackshields G, *et al.* (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Li W-H (1997) 'Molecular evolution.' (Sinauer Associates).
- Lindstrom L, Alatalo RV, Lyytinen A, Mappes J (2001a) Predator experience on cryptic prey affects the survival of conspicuous aposematic prey. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**, 357-361.
- Lindstrom L, Alatalo RV, Lyytinen A, Mappes J (2001b) Strong antiapostatic selection against novel rare aposematic prey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 9181-9184.
- Lu GQ, Bernatchez L (1999) Correlated trophic specialization and genetic divergence in sympatric lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis*): Support for the ecological speciation hypothesis. *Evolution* **53**, 1491-1505.
- Lynn SK (2005) Learning to avoid aposematic prey. *Animal Behaviour* **70**, 1221-1226.
- Mallet J (1986) Hybrid zones of *Heliconius* butterflies in Panama and the stability and movement of warning color clines. *Heredity* **56**, 191-202.
- Mallet J (2001) Causes and consequences of a lack of coevolution in müllerian mimicry. *Evolutionary Ecology* **13**, 777-806.
- Mallet J (2010) Shift happens! Shifting balance and the evolution of diversity in warning colour and mimicry. *Ecological Entomology* **35**, 90-104.

- Mallet J, Barton N, Lamas G, Santisteban J, Muedas M, Eeley H (1990) Estimates of selection and gene flow from measures of cline width and linkage disequilibrium in *Heliconius* hybrid zones. *Genetics* **124**, 921-936.
- Mallet J, Barton NH (1989) Strong natural selection in a warning-color hybrid zone. *Evolution* **43**, 421-431.
- Mallet J, Jiggins CD, McMillan W (1996) Evolution: Mimicry meets the mitochondrion. *Current Biology* **6**, 937-940.
- Mallet J, Joron M (1999) Evolution of diversity in warning color and mimicry: Polymorphisms, shifting balance, and speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**, 201-233.
- Mallet J, Singer MC (1987) Individual selection, kin selection, and the shifting balance in the evolution of warning colors: the evidence from butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society* **32**, 337-350.
- Manica A, Amos W, Balloux F, Hanihara T (2007) The effect of ancient population bottleneck on human phenotypic variation. *Nature* **448**, 346-349.
- Mappes J, Alatalo RV (1997) Effects of novelty and gregariousness in survival of aposematic prey. *Behavioral Ecology* **8**, 174-177.
- Mappes J, Marples N, Endler JA (2005) The complex business of survival by aposematism. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 598-603.
- Marek PE, Bond JE (2009) A Müllerian mimicry ring in Appalachian millipedes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9755-9760.
- Marples NM, Roper TJ, Harper DGC (1998) Responses of wild birds to novel prey: evidence of dietary conservatism. *Oikos* **83**, 161-165.
- Marshall GAK (1908) On diaposematism, with reference to some limitations of the Müllerian hypothesis of mimicry. *Transactions of the Entomological Society of London* **VII**, 93-142.

- Merchan HA, Jiggins CD, Linares M (2005) A narrow *Heliconius cydno* (Nymphalidae; Heliconiini) hybrid zone with differences in morph sex ratios. *Biotropica* **37**, 119-128.
- Müller F (1878) Über die vorteile der mimicry bei schmetterlingen. *Zoologischer Anzeiger* **1**, 54-55.
- Myers CW, Daly JW (1983) Dart-poison frogs. *Scientific American* **248**, 120-133.
- Niehuis O, Hofmann A, Naumann CM, Misof B (2007) Evolutionary history of the burnet moth genus *Zygaena* Fabricius, 1775 (Lepidoptera: Zygaenidae) inferred from nuclear and mitochondrial sequence data: phylogeny, host-plant association, wing pattern evolution and historical biogeography. *Biological Journal of the Linnean Society* **92**, 501-520.
- Noonan BP, Comeault AA (2009) The role of predator selection on polymorphic aposematic poison frogs. *Biology Letters* **5**, 51-54.
- Noonan BP, Gaucher P (2006) Refugial isolation and secondary contact in the dyeing poison frog *Dendrobates tinctorius*. *Molecular Ecology* **15**, 4425-4435.
- Pinheiro CEG (2003) Does Müllerian mimicry work in nature? Experiments with butterflies and birds (Tyrannidae). *Biotropica* **35**, 356-364.
- Pough FH (1988) Mimicry in vertebrates: Are the rules different? *The American Naturalist* **131**, S67-S102.
- Poulin B, Lefebvre G, Ibanez R, Jaramillo C, Hernandez C, Rand AS (2001) Avian predation upon lizards and frogs in a neotropical forest understorey. *Journal of Tropical Ecology* **17**, 21-40.
- Pray LA, Goodnight CJ (1995) Genetic variation in inbreeding depression in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Evolution* **49**, 176-188.
- Pray LA, Goodnight CJ (1997) The effect of inbreeding on phenotypic variance in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Evolution* **51**, 308-313.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.



- Randall JE (2005) A review of mimicry in marine fishes. *Zoological Studies* **44**, 299-328.
- Raymond R, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **83**, 248-249.
- Riipi M, Alatalo RV, Lindstrom L, Mappes J (2001) Multiple benefits of gregariousness cover detectability costs in aposematic aggregations. *Nature* **413**, 512-514.
- Ritland DB, Brower LP (1999) The viceroy butterfly is not a Batesian mimic. *Nature* **350**, 805-809.
- Roberts JL, Brown JL, Schulte R, Arizabal W, Summers K (2007) Rapid diversification of colouration among populations of a poison frog isolated on sky peninsulas in the central cordilleras of Peru. *Journal of Biogeography* **34**, 417-426.
- Roberts JL, Brown JL, von May R, Arizabal W, Presar A, Symula R, Schulte R, Summers K (2006) Phylogenetic relationships among poison frogs of the genus *Dendrobates* (Dendrobatidae): A molecular perspective from increased taxon sampling. *Herpetological Journal* **16**, 377-385.
- Robertson JM, Robertson AD (2008) Spatial and temporal patterns of phenotypic variation in a Neotropical frog. *Journal of Biogeography* **35**, 830-843.
- Ross KG, Keller L (1995) Joint influence of gene flow and selection on a reproductively important genetic polymorphism in the fire ant *Solenopsis invicta*. *The American Naturalist* **146**, 325-348.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-Statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103.
- Rowland HM, Ihalainen E, Lindstrom L, Mappes J, Speed MP (2007) Co-mimics have a mutualistic relationship despite unequal defences. *Nature* **448**, 64-67.

- Rudh A, Rogell B, Hoglund J (2007) Non-gradual variation in colour morphs of the strawberry poison frog *Dendrobates pumilio*: genetic and geographical isolation suggest a role for selection in maintaining polymorphism. *Molecular Ecology* **16**, 4284-4294.
- Ruxton GD, Sherratt TN, Speed MP (2004) 'Avoiding Attack: The Evolutionary Ecology of Crypsis, Aposematism, and Mimicry.' (Oxford University Press: Oxford U.K.).
- Sanders KL, Malhotra A, Thorpe RS (2006) Evidence for a Müllerian mimetic radiation in Asian pitvipers. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**, 1135-1141.
- Sandoval CP (1994) The effects of the relative geographic scales of gene flow and selection on morph frequencies in the walking-stick, *Timema christinae*. *Evolution* **48**, 1866-1879.
- Saporito RA, Zuercher R, Roberts M, Gerow KG, Donnelly MA (2007) Experimental evidence for aposematism in the dendrobatid poison frog *Oophaga pumilio*. *Copeia* **2007**, 1006-1011.
- Schneider C, Moritz C (1999) Rainforest refugia and evolution in Australia's Wet Tropics. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **266**, 191-196.
- Schneider CJ, Smith TB, Larison B, Moritz C (1999) A test of alternative models of diversification in tropical rainforests: Ecological gradients vs. rainforest refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13869-13873.
- Schulte R (1999) 'Die Pfeilgiftfrösche Vol. II Artenteil.' (INIBICO: Waiblingen).
- Sheppard PM, Turner JRG, Brown KS, Benson WW, Singer MC (1985) Genetics and the Evolution of Müllerian Mimicry in *Heliconius* Butterflies *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **308**, 433-613.
- Sherratt TN (2006) Spatial mosaic formation through frequency-dependent selection in Müllerian mimicry complexes. *Journal of Theoretical Biology* **240**, 165-174.
- Sherratt TN (2008) The evolution of Müllerian mimicry. *Naturwissenschaften* **95**, 681-695.

- Sherratt TN, Beatty CD (2003) The evolution of warning signals as reliable indicators of prey defense. *The American Naturalist* **162**, 377-389.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.
- Smith TB, Schneider CJ, Holder K (2001) Refugial isolation versus ecological gradients. *Genetica* **112**, 383-398.
- Smith TB, Wayne RK, Girman DJ, Bruford MW (1997) A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science* **276**, 1855-1857.
- Speed MP (2000) Warning signals, receiver psychology and predator memory. *Animal Behaviour* **60**, 269-278.
- Speed MP (2001) Can receiver psychology explain the evolution of aposematism? *Animal Behaviour* **61**, 205-216.
- Stamp NE, Wilkens RT (1993) On the cryptic side of life: being unapparent to enemies and the consequences for foraging and growth in caterpillars. In 'Catterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging'. (Eds NE Stamp, TM Casey) pp. 283-330. (Chapman and Hall: New York).
- Stiles FG, Skutch AF (1989) 'A guide to the birds of Costa Rica.' (Cornell University Press, New York).
- Storfer A, Sih A (1998) Gene flow and ineffective antipredator behavior in a stream-breeding salamander. *Evolution* **52**, 558-565.
- Summers K, Cronin TW, Kennedy T (2004) Cross-breeding of distinct color morphs of the strawberry poison frog (*Dendrobates pumilio*) from the Bocas del Toro Archipelago, Panama. *Journal of Herpetology* **38**, 1-8.
- Summers K, McKeon CS (2004) The evolutionary ecology of phytotelmata use in poison frogs. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan* **193**, 55-73.

- Symula R, Schulte R, Summers K (2001) Molecular phylogenetic evidence for a mimetic radiation in Peruvian poison frogs supports a Müllerian mimicry hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**, 2415-2421.
- Symula R, Schulte R, Summers K (2003) Molecular systematics and phylogeography of Amazonian poison frogs of the genus *Dendrobates*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**, 452-475.
- Thomas RJ, Marples NM, Cuthill IC, Takahashi M, Gibson EA (2003) Dietary conservatism may facilitate the initial evolution of aposematism. *Oikos* **101**, 458-466.
- Turner JRG (1971) Studies of Müllerian mimicry and its evolution in burneth moths and heliconid butterflies. In 'Ecological Genetics and Evolution'. (Ed. ER Creed). (Blackwell: Oxford).
- Twoney E, Brown J (2006) [www.Dendrobates.org](http://www.Dendrobates.org).
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Wade MJ, Goodnight CJ (1991) Wright shifting balance theory: an experimental study. *Science* **253**, 1015-1018.
- Wade MJ, Goodnight CJ (1998) Perspective: The theories of Fisher and Wright in the context of metapopulations: When nature does many small experiments. *Evolution* **52**, 1537-1553.
- Wang IJ, Shaffer HB (2008) Rapide color evolution in an aposematic species: a phylogenetic analysis of color variation in the strikingly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Evolution* **62**, 2742-2759.
- Wang JL (2004) Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conservation Biology* **18**, 332-343.
- Weber JL, Wong C (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* **2**, 1123-1128.

- Whinnett A, Zimmermann M, Willmott KR, Herrera N, Mallarino R, Simpson F, Joron M, Lamas G, Mallet J (2005) Strikingly variable divergence times inferred across an Amazonian butterfly 'suture zone'. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **272**, 2525-2533.
- Whitlock MC (1995) Two-locus drift with sex chromosomes: the partitioning and conservation of variance in subdivided populations. *Theoretical Population Biology* **48**, 44-64.
- Williams P (2007) The distribution of bumblebee colour patterns worldwide: possible significance for thermoregulation, crypsis, and warning mimicry. *Biological Journal of the Linnean Society* **92**, 97-118.
- Wright S (1931) Evolution in mandelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Wright S (1932) The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. *Proceedings of the VI International Congress of Genetics* **1**, 356-366.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.
- Wright S (1978) 'Evolution and the Genetics of Populations. Variability Between and Among Natural Populations.' (University Chicago Press: Chicago).
- Zimmermann H, Zimmermann E (1988) Etho-taxonomie und zoogeographische Artengruppenbildung bei Pfeilgiftfröschen (Anura: Dendrobatidae). *Salamandra* **24**, 125-160.
- Zrzavy J, Nedved O (1999) Evolution of mimicry in the New World *Dysdercus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 956-969.

